

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年2月21日 (21.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/14481 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/08, A61K 35/26, A61P 37/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07032

(22) 国際公開日: 2001年8月15日 (15.08.2001)

(25) 国際公開の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-247072 2000年8月16日 (16.08.2000) JP(71) 出願人/米国を除く全ての指定国について: 寶酒
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto
(JP).(72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 佐川裕章
(SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県草津市西浜川二丁目6-32 Shiga (JP), 出野美津子 (IDENO,
Mitsuko) [JP/JP]; 〒616-8176 京都府京都市右京区
太秦乾町28番地7 Kyoto (JP), 加藤郁之進 (KATO,
Ikumoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府宇治市南陵町
1-1-150 Kyoto (JP).(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒
540-6591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号
OMMビル5階私書箱26号細田国際特許事務所内 Osaka
(JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EXTENSIVE CULTURE OF ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC T CELLS

(54) 発明の名称: 抗原特異的細胞傷害性T細胞大培養方法

(57) Abstract: A method of inducing, maintaining and extensively culturing CTLs (cytotoxic T cells), which sustain an antigen-specific cytotoxicity at a high level and are appropriately usable in adoptive immunotherapy, by using at least one compound selected from the group consisting of acidic polysaccharides, acidic oligosaccharides, acidic monosaccharides and salts thereof as the active ingredient. Examples of the above-described compound include fucoidan, heparin, alginic acid, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, pectic acid, hyaluronic acid, fucoidan degradation products, sulfated glucose, sulfated fucose and salts thereof.

(57) 要約:

本発明は、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を有効成分として使用する、養子免疫療法への使用に適した、抗原特異的な細胞障害活性を高いレベルで保持したCTL（細胞障害性T細胞）を誘導、維持、ならびに拡大培養する方法を提供する。前記化合物としては、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなるものが挙げられる。



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

抗原特異的細胞傷害性T細胞拡大培養方法

技術分野

本発明は、医療分野において有用な、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を誘導、維持ならびに拡大培養する方法に関する。

背景技術

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球（以下、B細胞）とTリンパ球（以下、T細胞）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

T細胞は、CD（Cluster Designation）4マーカーを有し主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞（以下、T_H）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞（T_c；細胞傷害性Tリンパ球（cytotoxic T lymphocyte）、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、CTLと記載することがある）に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合抗原複合体（MHC：ヒトにおいてはヒト白血球抗原（HLA）と称することもある。）クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原（抗原性ペプチド）を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT細胞レセプター（以下、TCRと称す）が前述した抗原性ペプチド及びMHCクラスI

分子を特異的に認識して、抗原性ペプチドが自己由来のものなのか、或は、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のCTL又はT細胞から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外（イン・ビトロ）で誘導した後、患者へ移入する養子免疫治療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルを用いた養子免疫治療法がウイルス感染及び腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されており〔グリーンバーク（Greenberg, P. D.）著、アドバンセズ・イン・イムノロジー（Advances in Immunology）、1992年発行）、さらに、免疫不全患者にCTLを投与することにより、毒性を示すことなく、急速かつ持続的にサイトメガロウイルスが排除される特異的CTL応答の再構築が行われた〔ブラッド（Blood）、第78巻、第1373～1380頁（1991）〕ことなどから、先天性、後天性及び医原性によるT細胞免疫不全症患者への使用も注目されている。この治療法ではCTLの抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

またCTLの細胞数の維持及び増加については、動物モデルでの研究からヒトの養子免疫療法において有効な細胞数を推測すると、 $10^8 \sim 10^{10}$ 個の抗原特異的T細胞が必要とされている〔グリーンバーク著、アドバンセズ・イン・イムノロジー、1992年発行〕。すなわち、養子免疫療法においては、イン・ビトロでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

CTLの抗原特異的傷害活性の維持及び増強については、CTLの抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、この方法は、一時的には細胞数が増える場合もあるが、最終的には、細胞数が減ってしまい、必要とする細胞数が得られない。この対応策とし

ては、抗原による刺激を繰り返す初期の段階において細胞を凍結保存するか、クローニングを行って得られた抗原特異的CTLクローンの、一部を凍結保存した後、長期培養により細胞数や抗原特異的傷害活性が低下した時に、凍結した細胞を融解して再度抗原刺激を繰り返すしかないのが、現状である。

マウスT細胞を用いて長期培養でT細胞を樹立する方法〔ネイチャー (Nature)、第294 巻、第697 ～699 頁(1981)〕が報告されているが、これはT細胞を単離・株化する方法であり、この方法でT細胞を $10^3 \sim 10^{10}$ 個の細胞まで増殖することは不可能である。次に、米国特許第5,057,423 号には、インターロイキン2 (IL-2) を高濃度で大量に使用してリンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞を誘導し、3～4 日間で細胞数を100 倍まで増やす方法が開示されている。これは、通常、1 個の細胞が分裂して2 個に増殖するのに約24 時間かかることを考えれば、飛躍的な細胞数である。また、同様に高濃度のIL-2 を用いて腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を誘導して養子免疫療法を試みている〔ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (New Engl. J. Med.)、第316 巻、第1310～1321 (1986) ; New Engl. J. Med.、第319 巻、第1676～1680 頁(1988) ; Blood、第81巻、第2093～2101頁(1993)〕。しかし、前者は抗原に対して非特異的なT細胞の取得法であり、後者は活性化しているポリクローナルなリンパ球集団を用いるために特異性があつたとしても僅かである。更に、上記の方法ではともに細胞増殖を促進する為に高濃度のIL-2 を用いており、高濃度のIL-2 で処理されたT細胞がIL-2 非存在下で特異的抗原刺激を受けた場合にアポトーシス (細胞死) を起こす可能性があるとの報告 (Nature、第353 巻、第858 ～861 頁(1991) ; ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.)、第23巻、第1552～1560頁(1992)) から、上記方法で得られたLAK細胞やTILの有効性には問題がある。

また、T細胞をT細胞増殖因子とIL-2 存在下で低密度 ($5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個/m l) で培養すると7 日間にわたって急速に増殖し、最終的には細胞

数が $3 \sim 5 \times 10^5$ 個/ ml という飽和密度まで増殖する。しかしながら、ひとたびこの飽和密度に達すると、細胞が常に死んでしまうという報告もある〔イムノロジカル・レビュー (Immunological Rev.、第54巻、第81～109 頁 (1981))〕。従って、LAK細胞、TIL及び低密度によるT細胞培養方法は、実用面においても、有用面においても問題を有している。

次に、抗原特異的なCTLに関しては、同系異種由来のサイトメガロウイルス (CMV) 特異的CTLをイン・ビトロにて5～12週間培養してCTLを増殖させた後、免疫不全の患者に静脈内投与する養子免疫療法 (Riddell et al., Science, 257: 238～240, 1992)、自己CMV感染繊維芽細胞とIL-2〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunology、第146 巻、第2795～2804頁 (1991))〕及び抗CD3モノクローナル抗体 (抗CD3mAb) とIL-2〔ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Imm. Methods)、第128 巻、第189～201 頁 (1990))〕を用いてCMV特異的CTLクローンを単離ならびに大量培養する方法が報告されている。しかし、これらの方法には大きな問題点が存在する。すなわち、 1×10^3 個/ ml の抗原特異的CTLを得るのに約3ヶ月を要してしまい、その間に患者の症状が進行してしまう為、状況に応じた対応をとることが難しい。

このような問題点を解決する方法として、国際公開第96/06929号パンフレットにはREM法 (rapid expansion method) が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTL及び T_H を含むT細胞の初期集団を短期間で増殖 (expand) させる方法である。つまり、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供できる点が特徴であるが、次のような問題点が存在する。REM法においては、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC (末梢血単核細胞) とエプスタイン・バールウイルス (EBV) 感染細胞とを用いて抗原特異的CTL数を増殖させているが、T細胞へのEBVトランスフォームB細胞 (EBV-B細胞) の混入の危険性が否定されない点 (安全性の

問題)、フィーダ細胞として大量のP BMC (必要とする抗原特異的CTL数の少なくとも約40倍のP BMC)が必要である点、増殖したCTLの抗原特異的細胞傷害活性が充分満足しうるものではない点、T細胞クローン以外のT細胞集団を用いて増殖させた場合、T細胞が有する抗原特異的な傷害活性は細胞の増殖と共に低下する点、等の問題を有している。

すなわち、従来の抗原特異的CTL調製法では、治療への使用に有効な抗原特異的な細胞傷害活性を有するCTLを、短期間で、かつ充分な量を調製するという、養子免疫療法において必要不可欠な問題が未だ解決されていないのが現状である。

本発明の目的は、養子免疫療法への使用に適した、抗原特異的な細胞傷害活性を高いレベルで保持したCTLを誘導、維持ならびに拡大培養する方法を提供することにある。

発明の開示

すなわち、本発明は、

〔1〕 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を誘導するための方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞への分化能を有する前駆細胞を抗原提示細胞とインキュベートする工程を含むことを特徴とする方法、

〔2〕 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である前記〔1〕記載の方法、

〔3〕 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を維持するための

方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞を継続培養する工程を含むことを特徴とする方法、

〔4〕 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である前記〔3〕記載の方法、

〔5〕 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を拡大培養する方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞をインキュベートする工程を含むことを特徴とする方法、

〔6〕 前記工程において、さらに抗CD3抗体の存在下に細胞傷害性T細胞をインキュベートする前記〔5〕記載の方法、

〔7〕 前記工程において、細胞傷害性T細胞をフィーダ細胞とともにインキュベートする前記〔5〕または〔6〕記載の方法、

〔8〕 フィーダ細胞が非ウイルス感染細胞である前記〔7〕記載の方法、

〔9〕 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である前記〔5〕～〔8〕いずれか記載の方法、

〔10〕 前記〔1〕～〔9〕いずれかに記載の方法によって得られた細胞傷害性T細胞含有培養物から抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を高含有する細胞集団を選択する工程を含む細胞傷害性T細胞の回収方法、

〔11〕 前記〔1〕～〔10〕いずれかに記載の方法で調製された抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞、ならびに

〔12〕 前記〔11〕に記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有するこ

とを特徴とする治療剤、
に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、ガゴメ昆布由来フコイダンのDEAE-セルロファインA-800
カラム溶出パターンを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より
選択される少なくとも1種の化合物により、意外にもCTLの抗原特異的な細胞
傷害活性の維持または増強能（以下、作用という場合がある）が発揮されること
を見出し、完成するに至ったものである。本発明により、前記化合物を有効成分
として使用する、養子免疫療法への使用に適した、抗原特異的な細胞傷害活性を
高いレベルで保持したCTLを誘導、維持ならびに拡大培養する方法が提供され
る。なお、本発明の有効成分として使用される化合物にD体とL体の別がある場
合、両者とも使用可能であるが、L体の使用が好適である。

以下、本発明を具体的に説明する。

（1）本発明の細胞傷害性T細胞の誘導方法

通常、抗原提示細胞により誘導されたCTLは、維持、増殖させる間にその抗
原特異的な細胞傷害活性を低下させていくことが知られている。本発明により、
誘導後の細胞を長期間にわたって維持または増殖させても、従来観察されたよう
な抗原特異的な細胞傷害活性が著しく低下しない抗原特異的なCTLの誘導方法
が提供される。

本発明のCTLの誘導方法は、前記有効成分の存在下にCTLを誘導すること
を1つの大きな特徴とする。CTLの誘導は、当該有効成分の存在下、得られる
CTLに所望の抗原に対する認識能力を付与するために、適切な抗原提示細胞と

ともにCTLへの分化能を有する前駆細胞をインキュベートすることにより実施される。前駆細胞は、CTLになる前段階で、しかもCTLに分化するように運命付けられている細胞であれば特に限定されるものではなく、たとえば、末梢血単核球(PBMC)、ナイーブT細胞、メモリーT細胞等が挙げられる。抗原提示細胞は、T細胞に対して認識すべき抗原を提示する能力を有する細胞であれば特に限定はない。例えば、単球、B細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、線維芽細胞等に所望の抗原を提示させ、本発明に使用することができる。

抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる(たとえば、文献: Bednarek M. A. ら, J. Immunology 147 p4047-4053 (1991)を参照)。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理(process)する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を付加することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとするCTLのHLA拘束性に合致する抗原ペプチドが使用される。

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、たとえば、細菌、ウイルス等の外来性抗原や腫瘍関連抗原(癌抗原)等の内在性抗原等が挙げられる。

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射又はマイトマイシン(mitomycin)等の薬剤による処理を行えばよい。

本発明のCTLの誘導方法において使用される培地には特に限定はなく、CTL、その前駆細胞、ならびに抗原提示細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地であってもよい。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、インターロイキン-2(IL

ー 2) を含有する培地が本発明に使用される。

本発明の有効成分として使用される酸性多糖としては、動物由来、植物由来、微生物由来、藻類由来および合成の酸性多糖のいずれもが使用できる。またリン酸化多糖類、例えば核酸も本願発明の酸性多糖に包含される。

動物由来の酸性多糖としては、例えばヒアルロン酸や種々の硫酸化多糖が使用でき、硫酸化多糖としてはコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン等が使用できる。また、ナマコ、ウニ、ヒトデ等の棘皮動物由来の硫酸化多糖、サメ軟骨等の魚類由来の硫酸化多糖も本発明に使用できる。硫酸化多糖を含有するナマコとしては、例えば特開平 4-91027 号公報に記載のナマコがあり、当該公報記載の方法にてナマコより硫酸化多糖を調製することができる。

植物由来の酸性多糖としては、例えばペクチン酸等が使用できる。

微生物由来の酸性多糖としては、例えばヒアルロン酸やキサンタンが使用できる。

藻類由来の酸性多糖としては、例えば褐藻類、紅藻類、緑藻類、藍藻類由来の酸性多糖が使用できる。

褐藻類由来の酸性多糖としては、例えば種々の硫酸化多糖が使用でき、例えばフコイダン、硫酸化フコガラクトン、硫酸化フコグルクロノマンナン、グルクロノキシロフカン、サルガッサン、グルクロノマンノガラクトン、キシロフコグルクロナン、アスコフィラン、グルクロノガラクトフカン、硫酸化グルクロノフカン等が使用できる。

また、原料となる褐藻類としては、例えばガゴメ昆布、マコンブ、トロロ昆布、ヒバマタ、モズク、オキナワモズク、ワカメ、クロメ、アラメ、カジメ、レソニア ニグレセンス、アスコフィラム ノドッサム、ジャイアントケルブ等の昆布目、ながもつも目、ひばまた目の褐藻が挙げられる。

褐藻類由来の硫酸化多糖としては、例えばガゴメ昆布からフコイダンを調製し

、該フコイダンをグルクロン酸含有フコイダン（U-フコイダンと称す）とグルクロン酸非含有フコイダン（F-フコイダンと称す）に分離することができ、本発明の有効成分としてそれぞれのフコイダンを使用することが出来る。またガゴメ昆布から硫酸化フコガラクトン（以下、G-フコイダンと称す）を調製し、本発明に使用することができる。

U-フコイダン及びF-フコイダンはガゴメ昆布からフコイダンを調製後、陰イオン交換樹脂、界面活性剤等を用いて分離される。ガゴメ昆布由来のU-フコイダン及びF-フコイダンの存在比は約1：2であり、U-フコイダンはフコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸等を含み硫酸含量は約20%、F-フコイダンはフコースとガラクトースを含み、硫酸含量は約50%、分子量は両物質共に約20万を中心に分布している（第18回糖質シンポジウム要旨集、第159頁、1996年）。

例えばガゴメ昆布から調製したフコイダン溶液をDEAE-セルロフィンA-800カラムにアプライ後、NaCl含有緩衝液にて濃度勾配法により溶出させることにより、U-フコイダンとF-フコイダんに分離することができる。第1図にその1例を示す。すなわち第1図はU-フコイダンとF-フコイダンの分離を示す図であり、図中前ピークがU-フコイダン、後ピークがF-フコイダンである。

紅藻類由来の酸性多糖としては、例えば硫酸化ガラクトン、カラギーナン、フノラン、アガロベクチン等が使用できる。また、紅藻類由来の寒天類、アガロースについても、本発明に使用することができる。

また、紅藻類としては、例えばマクサ、オゴノリ、ブテロクラディア カピラセア等が挙げられる。

緑藻類由来の酸性多糖としては、例えばラムナン硫酸が使用できる。緑藻類としては、例えばアオサ、アオノリ、カサノリ、クロレラ等が挙げられる。またスピルリナ等の藍藻類から得られる酸性多糖も本発明に使用できる。

本発明においては、アルギン酸、ペクチン酸、ヒアルロン酸等をそのまま本発明の有効成分である酸性多糖として使用可能であるが、さらに、それらに対し、たとえば、硫酸基を付加した合成酸性多糖も使用可能である。当該合成酸性多糖としては、例えば合成硫酸化多糖を挙げることができ、セルロース、デンプン、マンナン、キシラン、アルギン酸、ペクチン、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フラクタン、アラビナン、キチン、プルラン、キシログルカン、デキストラン、スターチ等の硫酸化物を使用することができる。さらに例えば、リボフラナン硫酸、キシロフラナン硫酸、レンチナン硫酸、カードラン硫酸、マンノピラナン硫酸、硫酸化スターチ、硫酸化ペクチン等の合成硫酸化多糖やパルミトイル基を有するリボフラナン硫酸等の合成硫酸化アルキル多糖を使用することができる。また硫酸化多糖をさらに硫酸化することにより、高硫酸化硫酸化多糖を調製し、合成酸性多糖として本発明に使用することができる。これらの合成酸性多糖はそれぞれ公知の方法で調製し、本発明に使用することができる。また市販のデキストラン硫酸、硫酸化セルロースも本発明に使用できる。また、これらの合成酸性多糖の塩を本発明に使用しても良い。

これらの酸性多糖の調製はそれぞれ公知の方法で調製すれば良く、精製物又は当該酸性多糖含有物等を本発明に使用することができる。酸性多糖含有物としては、例えば藻類由来酸性多糖画分が好適に使用でき、藻類としては、前述した藻類を原料として好適に使用することができる。

また、これらの酸性多糖を分解して得られる低分子化された酸性多糖も細胞傷害性T細胞の抗原特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有していれば、本発明の酸性多糖として使用することができる。

次に本発明で使用できる酸性オリゴ糖、酸性単糖としては、細胞傷害性T細胞の抗原特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する酸性オリゴ糖、酸性単糖であれば良く、特に限定はないが、前出の酸性多糖の分解物、合成酸性オリゴ糖および合成酸性単糖が使用できる。また、酸性オリゴ糖、酸性単糖としては

、例えば硫酸化オリゴ糖および硫酸化単糖が例示される。これらの硫酸化オリゴ糖、硫酸化単糖は、それぞれ対応するオリゴ糖、単糖を原料として、それぞれ公知の方法にて硫酸化して調製することができる。また、これらの塩も好適に使用できる。また、本発明において酸性単糖としては例えば硫酸化フコース、硫酸化グルコース、硫酸化ガラクトース、硫酸化キシロース、硫酸化2-デオキシグルコース、硫酸化マンノース、硫酸化タロース等の硫酸化単糖が例示される。これらの硫酸化単糖は合成法で合成しても良く、また天然物中から得た硫酸化多糖を分解し、当該分解物中より精製して調製しても良い。また常法によりその塩を調製し、本発明に使用することもできる。また、前述した硫酸化多糖と同様に、これらの硫酸化オリゴ糖および硫酸化単糖をさらに硫酸化することにより、高硫酸化硫酸化オリゴ糖および高硫酸化硫酸化単糖を使用することができる。なお本発明においてオリゴ糖とは単糖が2個から10個の範囲でつながった糖化合物、多糖とは単糖が11個以上つながった糖化合物と定義する。

また本発明の細胞傷害性T細胞の抗原特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する酸性多糖の分解物は、酵素学的方法、化学的方法、物理的方法等の公知の方法にて調製し、細胞傷害性T細胞の特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する分解物を選択し、使用することができる。

なお、分解物とは、分解対象とする酸性多糖にもよるが、酸性多糖を分解して得た、概ね分子量が好ましくは10万～200、より好ましくは3万～1000の範囲のものをいう。

本発明で使用する酸性多糖の分解物の好適な調製方法としては酸分解法があり、当該酸性多糖を酸分解することにより細胞傷害性T細胞の特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する分解物を調製することができる。

本発明で使用する酸性多糖の酸分解条件は、細胞傷害性T細胞の特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する分解物（以下、本発明の分解物と称す）が生成する条件であれば、特に限定はない。

例えば酸性多糖を酸水溶液等に溶解またはけん濁し、酸分解反応を行うことにより、本発明の分解物が生成する。また、反応時に加熱することにより、本発明の分解物の生成に必要な時間が短縮される。

酸性多糖を溶解又はけん濁する酸の種類は、特に限定するものではないが、塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸、また陽イオン交換樹脂、陽イオン交換繊維、陽イオン交換膜等の固体酸が使用可能である。

酸の濃度も特に限定はないが、好ましくは0.0001～5規定、より好ましくは0.01～1規定程度の濃度で使用可能である。また、反応温度も特に限定は無いが好ましくは0～200℃、より好ましくは20～130℃に設定すれば良い。

また、反応時間も特に限定するものではないが、好ましくは数秒～数日に設定すれば良い。酸の種類と濃度、反応温度及び反応時間は、本発明に使用する分解物の生成量、分解物の重合度により適宜選択すれば良い。例えば、フコイダンの分解物の製造に際しては、クエン酸、乳酸、リンゴ酸等の有機酸を使用し、酸の濃度は数10mM～数M、加熱温度は50～110℃、好適には70～95℃、加熱時間は数分～24時間の範囲から適宜選択することにより、本発明の分解物を調製することができる。フコイダンの酸分解物としてはガゴメ昆布由来フコイダンの酸分解物が例示される。

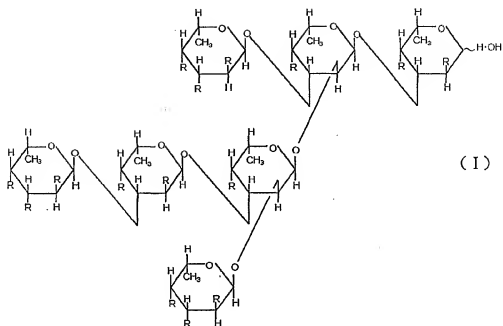
本発明の分解物は細胞傷害性T細胞の特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強作用を指標としてさらに分画することができ、例えば酸分解物をゲルろ過法、分子量分画膜による分画法等により分子量分画することができる。

ゲルろ過法の例としては、セルロフィンGCL-300を使用し、例えば分子量25000超、分子量25000～100000超、分子量10000～50000超、分子量5000以下等の任意の分子量画分を調製でき、セルロフィンGCL-25を用い、例えば分子量5000以下の画分を分子量5000～30

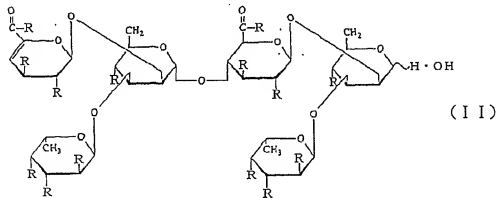
00超、分子量3000～2000超、分子量2000～1000超、分子量1000～500超、分子量500以下等の任意の分子量画分に調製することができる。

また、限外ろ過膜を用いて工業的に分子量分画を行うことができ、例えばダイセル社製FE10-FUSO382を使用することにより分子量3000以下の画分を、同FE-FUS-T653を使用することにより分子量6000以下の画分を調製することができる。更にナノフィルター膜を使用することにより分子量500以下の画分を得ることもでき、これらのゲルろ過法、分子量分画法を組み合わせるにより、任意の分子量画分を調製することができる。

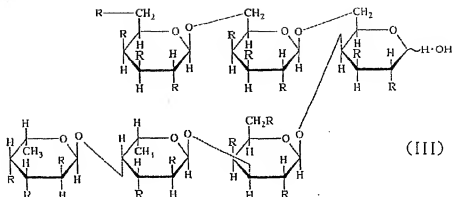
本発明で利用できる酸性多糖の分解物、例えばフコイダンの分解物としては、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物が例示され、これらの化合物は国際公開第99/41288号パンフレット、国際公開第96/34004号パンフレット、国際公開第00/50464号パンフレット記載の方法で調製することができる。なお、式(I)で表される化合物を基本骨格とし、その繰返し構造を有するフコイダン、及びオリゴ糖、式(II)で表される化合物を基本骨格とし、その繰返し構造を有するフコイダン、及びオリゴ糖もそれぞれ本発明の酸性多糖および酸性オリゴ糖として使用することができる。また、本発明の酸性多糖の分解物としては、例えばフコイダンの分解物として、国際公開第99/41288号パンフレット、国際公開第96/34004号パンフレット、国際公開第00/50464号パンフレット記載のフコイダンの分解物が例示される。



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)

式(I)で表される化合物は前出F-フコイタンを、アルテロモナス *s.p.* SN-1009 (FERM BP-5747) が産生するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (F-フコイタン特異的分解酵素) で処理し、その分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(I)で表される化合物の多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

式(II)で表される化合物は前出U-フコイタンを、フラボバクテリウム *s.p.* SA-0082 (FERM BP-5402) が産生するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (U-フコイタン特異的分解酵素) で処理し、その分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(II)で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

なお式（I）で表される化合物の例としては後述の式（IV）で表される化合物がある。また式（II）で表される化合物の例としては後述の式（VI）で表される化合物がある。また式（III）で表される化合物の例としては後述の式（V）で表される化合物がある。

ガゴメ昆布由来フコイダンをアルテロモナス *s.p.* SN-1009（FERM BP-5747）が産生するF-フコイダン分解酵素、及びフラボバクテリウム *s.p.* SA-0082（FERM BP-5402）が産生するU-フコイダン分解酵素で分解し、分解物を除去することにより、前出G-フコイダンを精製することができる。

フラボバクテリウム *s.p.* SA-0082（FERM BP-5402）はこのG-フコイダンを特異的に分解するエンド型硫酸化多糖分解酵素（G-フコイダン分解酵素）も産生し、当該G-フコイダン分解酵素をG-フコイダンに作用させることにより、当該G-フコイダンの分解物を調製し、当該分解物中より、目的に応じ分解物を精製することができる。式（II）で表される化合物はその例である。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式（II）で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

なお、上記各酵素については、国際公開第97/26896号パンフレットまたは国際公開第00/50464号パンフレットに記載されている。

またガゴメ昆布由来フコイダンを有機酸存在下で、加熱処理することによりグルクロン酸とマンノースの重合体を得ることができ、この重合体も本発明の細胞傷害性T細胞の抗原特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を有する酸性多糖として使用することができる。また加熱処理条件、加熱時間を調整することにより任意の重合度の重合体を調製することができる。

以上、本発明において使用する有効成分は、CTLの抗原特異的な細胞傷害活

性を維持あるいは増強する作用を有する限り特に限定はなく、さまざまな酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及び／又はそれらの塩が使用できるが、特に好適には、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種を使用することができる。また、本発明においては、これまでに医薬品として使用されてきた酸性多糖の使用が好適であり、例えばデキストラン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、ヘパリン等が使用できる。デキストラン硫酸ナトリウムは *Leucostoc mesenteroides van Tieghem* によるショ糖の発酵によって生産されたデキストランの部分分解物を硫酸化して得た硫酸化エステルのナトリウム塩である。

本発明に使用される酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖の塩としては、CTLの抗原特異的な細胞傷害活性を維持あるいは増強する作用を有する限り特に限定はないが、たとえば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基等との塩が例示される。たとえば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、またはジエタノールアミン、エチレンジアミン等との塩が挙げられる。これらの塩は、たとえば、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖に存在する酸性基、例えばフコイダン等に存在する硫酸基やカルボキシル基を公知の方法により塩に変換することで得られる。かかる塩としては薬理学的に許容され得る塩が好ましい。

本発明で有効成分として使用される酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及び／又はそれらの塩は単独で若しくは2種以上混合して用いることができる。また、当該有効成分の誘導体、例えば脂肪酸誘導体等も、CTLの特異的な細胞傷害活性の維持あるいは増強能を示す限り、特に限定なく使用することができる。

本発明においては、CTLへの分化能を有する前駆細胞を抗原提示細胞とともにインキュベート（共培養）して、CTLを誘導するための一般的な条件は公知

の条件（たとえば、文献：Bednarek M.A. ら、J. Immunology 147 p4047-4053 (1991)を参照）に従えばよい。共培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。この共培養は通常、2～15日程度実施されるが、その間に抗原提示細胞を新たに調製したものに取り替えて再刺激を行ってもよい。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

共培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではないが、好ましくは0.001～1000μg/ml、より好ましくは0.01～100μg/mlである。なお、有効成分は培地中に溶解して存在するのが好ましい。

こうして誘導されたCTLは所望の抗原を特異的に認識する能力を有しており、例えば該抗原を有する細胞を、その細胞傷害活性により特異的に破壊する。このCTLの細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。たとえば、抗原提示細胞により提示されたペプチドと放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する傷害性、放射能の取り込みによって測定できるCTL増殖の抗原特異的な増加若しくはCTLや標的細胞より抗原特異的に遊離されるGM-CSF、IFN-γ等のサイトカイン量を測定することにより評価することができる（後述の実施例1-1-（3）を参照）。その他、蛍光色素等によって標識された抗原ペプチドや複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えばCTLをCTL特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させてから第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS（fluorescence-activated cell sorting）分析によって行うことができる。

本発明の方法により誘導されたCTLは、誘導後の細胞を長期間にわたって維持、あるいはこれを増殖させても、従来観察されたような抗原特異的な細胞傷害活性の著しい低下がないという優れた性質を有している。従って、誘導されたC

T Lをクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。例えば、誘導されたC T Lに抗原、各種サイトカイン、抗C D 3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。このC T Lの維持、拡大培養には、後述する本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法、拡大培養方法の使用が好適である。

このような本発明の効果は、本発明の方法で誘導されたC T Lを適切な方法で維持、あるいは拡大培養した後に、その細胞傷害活性を上記に記載された方法により測定し、確認することができる。

(2) 本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法

本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法は、C T Lを抗原特異的な細胞傷害活性を保ったままで維持する方法である。該方法は、本発明の有効成分を含有する培地中でC T Lを継続培養することを1つの大きな特徴としており、該細胞の有する抗原特異的な細胞傷害活性を継続的に維持させることができる。

上記方法を適用可能なC T Lには限定はなく、公知の方法で得られたC T Lをその抗原特異的な傷害活性を維持させたまま、本発明の方法で維持することができる。また、上記(1)に記載の本発明の細胞傷害性T細胞の誘導方法によって得られたC T Lの維持にも好適に使用される。

本発明においては、C T Lの継続培養の一般的な条件は公知の条件〔たとえば、文献：Carter J. ら、Immunology 1986 Jan. 57(1) p123-129を参照〕に従えばよい。本発明の細胞傷害性T細胞の維持方法に使用される培地にも特に限定はなく、たとえば上記のC T Lの誘導方法に使用される培地を使用することができる。

本発明の方法は、前記有効成分を培地に添加して実施される。培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではないが、好ましくは $0.001 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。なお、有効成分は培地中に溶解して存在

するのが好ましい。また、前記有効成分としては、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種が好適である。さらに、培地にはサイトカインやその他の公知の成分を所望により添加することができる。本発明には好適にはIL-2を含有する培地が使用される。培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

上記のように、本発明の有効成分を含有する培地中にてCTLを継続的に培養することにより、その特異的な細胞傷害活性の低下を抑制してCTLを維持することができる。このような本発明の効果は、本発明の方法で維持されたCTLの有する細胞傷害活性を、上記(1)に記載された方法により測定し、確認することができる。また、該方法で維持されたCTLは公知の拡大培養法により増殖させることができるが、こうして増殖されたCTLも特異的な細胞傷害活性を保持している。なお、CTLの拡大培養方法としては、後述する本発明のCTLの拡大培養方法を好適に使用することができる。

(3) 本発明の細胞傷害性T細胞の拡大培養方法

細胞傷害性T細胞は適切な条件下で培養を行うことにより、細胞数を増加させることができる(拡大培養)。従来、いくつかのCTLの拡大培養方法が開発されているが、短期間で効率よくCTLを増殖させることが可能なものとしてリデル(Ridell)らの開発した前出のREM法が知られている。該方法はX線照射により非増殖性としたPBMC(フィーダ細胞として使用)とEBVで形質転換されたB細胞(EBV-B細胞)とを使用し、IL-2、抗CD3モノクローナル抗体の存在下にCTLを培養する方法である。しかしながら、該方法ではT細胞へのEBV-B細胞の混入の危険性が否定されない点が問題とされていた。

本発明の細胞傷害性T細胞の拡大培養方法は、抗原特異的な細胞傷害活性を保ったままで当該細胞数を増加させることが可能な方法である。該方法は、本発明の前記有効成分の存在下に細胞をインキュベート（培養）することとを特徴とする。

本発明の方法において、適用可能なCTLには限定はなく、公知の方法で得られたCTLや、上記（１）に記載の本発明のCTLの誘導方法によって得られたCTLや、上記（２）に記載の本発明のCTLの維持方法によって得られたCTLの拡大培養に好適に使用することができる。なお、本発明においては、CTLの拡大培養の一般的な条件は公知の条件（たとえば、文献：Uberi J.P. ら、Clin. Immunol. Immunopathol. 1994 Mar. 70(3) p234-240 を参照）に従えばよい。

本発明の細胞傷害性T細胞の拡大培養方法においては、前記有効成分に加え、抗CD3抗体、好ましくは抗CD3モノクローナル抗体をさらに含有する培地中でCTLを培養するのが望ましい。また、さらに好適には、CTLは適切なフィーダ細胞と共培養される。

上記方法に使用される培地には特に限定はなく、CTLの培養、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地であってもよい。なお、CTLをフィーダ細胞と共培養する場合には、CTL、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の公知の成分を含んでもよく、例えば、IL-2を含有する培地が本発明に好適に使用される。抗CD3抗体、特に抗CD3モノクローナル抗体はCTL上のT細胞レセプターを活性化する目的で添加することができる。なお、抗CD3抗体の培地中における含有量は公知の条件に従って決定すればよく、たとえば、0.01～1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が好適である。

本発明のCTLの拡大培養方法は、前記有効成分を培地に添加して実施される

。なお、前記有効成分としては、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種が好適である。また、培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではないが、好ましくは $0.001 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。なお、有効成分は培地中に溶解して存在するのが好ましい。

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3抗体と協同してCTLを刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやEBV-B細胞が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は公知の条件に従って決定すればよく、たとえば、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ が好適である。

本発明の特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウイルス感染細胞、たとえば、EBV-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養されたCTL中にEBVが混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のようなCTLを利用した医療の安全性を高めることが可能となる。

本発明の細胞傷害性T細胞の拡大培養方法において、その培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。

なお、CTLの拡大培養方法については、本発明の有効成分を使用されている培地に添加していれば特に限定は無く、上記以外の従来のCTL拡大培養法において、本発明の有効成分を培地に添加する態様も本発明に包含される。

本発明の拡大培養方法によれば、例えば14日間の拡大培養によって $100 \sim 1000$ 倍に細胞数の増加したCTLを得ることができる。さらに、こうして得

られたCTLは従来のCTL拡大培養法、例えばREM法で得られたものに比べてより高い抗原特異的な細胞傷害活性を保持している。

このような本発明の効果は、本発明の方法で拡大培養されたCTLの有する細胞傷害活性を、上記(1)に記載された方法により測定し、確認することができる。

また、本発明に使用される有効成分は、CTLの抗原特異的な細胞傷害活性の維持または増強に働く、CTL誘導剤、CTL維持剤あるいはCTL拡大培養剤（以下、これらをCTL培養剤という）として使用することができる。当該CTL培養剤は、有効成分そのもの、またはさらにその他の任意の成分、たとえば、CTLの誘導方法において使用される培地、CTLの維持方法において使用される培地またはCTLの拡大培養方法において使用される培地に含まれる、CTLやフィード細胞等の培養、生育に必要な成分、ならびに適当なタンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。また、これらのCTL培養剤を含有する培地はCTL誘導用、維持用、あるいは拡大培養用培地（以下、これらをCTL用培地という）として使用することができる。これらの培地は細胞培養のための基本的な成分と上記の化合物の他、それぞれの用途に応じた適切な成分を任意に含むものである。なお、前記CTL培養剤およびCTL用培地は公知の方法により製造することができる。

上記の本発明のCTLの誘導方法、維持方法ならびに拡大培養方法を用いることにより得られたCTL含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等のCTL以外の細胞も混在している。本発明においては、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の方法により得られたCTLとして、たとえば、そのまま使用することができる。

また、さらに該培養物から、抗原特異的な細胞傷害活性を有するCTLを高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られたCTLとして使用することもできる。すなわち、本発明においては、前記CTL含有

培養物中のCTL以外の細胞（たとえば、ヘルパーT細胞）とCTLとの分離操作を施すことにより抗原特異的な細胞傷害活性に関して濃縮された細胞集団を調製して使用することができる。このような、前記細胞集団を分離することによる抗原特異的な細胞傷害活性の濃縮は従来のREM法ではなしえなかったことである。よって、本発明の一態様として、本発明のCTLの誘導方法、維持方法ならびに拡大培養方法のいずれかにより得られたCTL含有培養物から抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を高含有する細胞集団を選択する工程を含む細胞傷害性T細胞の回収方法が提供される。なお、本発明のCTLの回収方法は、1つには高い抗原特異的な細胞傷害活性を有するCTLの細胞集団を選択的に得る方法をいうが、広義には、当該CTLの細胞集団を生産または獲得する方法をいう。該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば上記のCTLの誘導方法、維持方法ならびに拡大培養方法を用いて得られたCTL含有培養物から、CTL細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD8抗体を結合させた磁気ビーズまたはカラムを用いてCTLのみを選択的に回収し、CTLを高含有する細胞集団を得ることができる。フローサイトメーターを用いてCTLを選択的に分離することもできる。また、本発明のCTLの誘導方法、維持方法ならびに拡大培養方法により得られたCTL含有培養物から、CTL以外の細胞を除去することにより、CTLを高含有する細胞集団を得ることができる。例えば、当該培養物からヘルパーT細胞を除去するためにヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD3抗体、抗CD4抗体を結合させた磁気ビーズまたはカラムを用いてヘルパーT細胞を選択的に除去し、CTLを高含有する細胞集団を得ることができる。また、ヘルパーT細胞の除去にはフローサイトメーターを用いることもできる。このようにして得られたCTLを高含有する細胞集団は、CTL含有培養物から非選択的に回収された細胞集団と比較してより強い細胞傷害活性を有しており、本発明の方法により得られたCTLとしてより好適に使用できる。また、本発明におい

てはCTLを高含有する細胞集団として、CTLのみの細胞集団も包含する。

また、本発明のCTLの維持方法ならびに拡大培養方法により得られたCTLを用いて、さらに本発明のCTLの維持方法ならびに拡大培養方法によりCTLの維持または拡大培養を行うこともできる。例えば、本発明の拡大培養方法により得られたCTLから上記の方法によりCTLを高含有する画分を得、該画分を用いて本発明の拡大培養方法を行うことにより、さらに細胞傷害活性の高いCTLを得ることもできる。また、本発明の拡大培養方法により得られたCTLを本発明の維持方法を用いてその細胞傷害活性を維持させておくこともできる。

さらに本発明は、上記の本発明のCTLの誘導方法、維持方法ならびに拡大培養方法で得られたCTLを提供する。かかるCTLは、いずれも抗原特異的な細胞傷害活性を有しており、長期間に渡る継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該CTLを有効成分として含有する治療剤を提供する。当該治療剤は、特に養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した抗原特異的な細胞傷害活性を有するCTLが、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は、製薬分野で公知の方法に従い、たとえば、本発明の方法により調製されたCTLを有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。当該CTLとしては、特に、本発明のCTL拡大培養方法によってEBV感染細胞を使用することなく調製されたCTLがこの目的に好適である。なお、治療剤におけるCTLの含有量、治療剤の投与量等、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定することができる。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は特段の事情がない限り重量％を意味する。

製造例 1

ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥物 20 kg を自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3 kg を溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物 20 kg を混合した。液温 12℃から液温 90℃となるまで水蒸気吹込みにより 40 分間昇温させ、次いでかくはん下 90～95℃に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 FE10-FC-FUS0382（分画分子量 3 万）を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回行い、脱塩処理を行い、ガゴメ昆布由来の抽出液 25 リットルを調製した。該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、ガゴメ昆布由来フコイダン乾燥物 13 g を得た。

製造例 2

製造例 1 記載のフコイダン乾燥物 7 g を、50 mM の塩化ナトリウムと 10% のエタノールを含む 20 mM のイミダゾール緩衝液（pH 8.0）700 ml に溶解し、遠心分離により不溶物を除去した。DEAE-セルロファイン A-800 カラム（φ 11.4 cm × 48 cm）（生化学工業社製）を同緩衝液にて平衡化し、遠心分離上清をアプライ後、同緩衝液で洗い、塩化ナトリウムの 50 mM から 1.95 M の濃度勾配により溶出させた（1 フラクション：250 ml）。フェノール硫酸法及びカルバザール硫酸法にて、総糖量及びウロン酸含量を求め、溶出順にフラクション 43～49、フラクション 50～55、フラクション 56～67 の画分を得た。次に、これらの画分を電気透析により脱塩後凍結乾燥し、フラクション 43～49 より I 画分（340 mg）、フラクション 50～55

より I I 画分 (870 mg)、フラクション 56~67 より I I I 画分 (2.64 g) をそれぞれ調製した。第 1 図にガゴメ昆布由来フコイダンの DEAE セルロファイン A-800 カラム溶出パターンを示す。第 1 図において縦軸はカルバゾール硫酸法での 530 nm の吸光度 (図中黒丸)、フェノール硫酸法での 480 nm の吸光度 (図中白丸)、及び電導度 (mS/cm; 図中白四角)、横軸はフラクション番号を示す。図中前ピークが U-フコイダン、後ピークが F-フコイダンである。

製造例 3

(1) アルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05% を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー社製) pH 8.2 からなる培地 600 ml を分注して殺菌した (120℃、20 分間) 2 リットルの三角フラスコに接種し、25℃ で 26 時間培養して種培養液とした。ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.02%、下記実施例 2-(2) に記載の硫酸化多糖 0.2%、及び消泡剤 (信越化学工業社製 KM70) 0.01% を含む人工海水 pH 8.0 からなる培地 20 リットルを 30 リットル容のジャーファメンターに入れて 120℃、20 分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600 ml を接種し、24℃ で 24 時間、毎分 10 リットルの通気量と毎分 250 回転のかはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。得られた培養上清を、排除分子量 1 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により濃縮後 85% 飽和硫酸塩析し、生じた沈殿を遠心分離により集め、10 分の 1 濃度の人工海水を含む 20 mM のトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) に対して充分透析し、600 ml の F-フコイダンに選択的に作用する F-フコイダン分解酵素液を調製した。

(2) 乾燥したガゴメ昆布 2 kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッ

ターミル（増幸産業社製）により粉碎し、得られた昆布のチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95℃に加温した40リットルの50mMの塩化ナトリウムを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.5に懸濁し、時々かくはんしながら95℃で2時間処理し、硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を3.5リットルの100mM塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。

両ろ液を合わせた後、30℃まで温度を下げ、3000Uのアルギン酸リアーゼ（ナガセ生化学工業社製）を添加後、エタノールを4リットル加え25℃で24時間かくはんした。次に遠心分離を行い、得られた上清を排除分子量10万のホロファイバーを備えた限外ろ過機により4リットルに濃縮し、更に、10%のエタノールを含む100mMの塩化ナトリウムにより、着色性物質がろ過されなくなるまで限外ろ過を続けた。

非ろ過液中に生じた沈殿は遠心分離により除去し、この上清を5℃まで温度を下げ、0.5N塩酸によりpHを2.0とした後、生じたタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を速やかに1N水酸化ナトリウムによりpHを8.0とした。

次に、排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過を行い、20mM塩化ナトリウムpH8.0により完全に溶媒置換後、再度pHを8.0として遠心分離後、凍結乾燥を行い、約95gの硫酸化多糖を調製した。

（3）乾燥したガゴメ昆布2kgを直径1mmのスクリーンを装着させたカッターミルにより粉碎し、得られた昆布のチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、30mlの上記製造例3-（1）で調製したF-フコイダン分解酵素、10%のエタノール、100mMの塩化ナトリウム、50mMの塩化

カルシウム、及び 50 mM のイミダゾールを含む 20 リットルの緩衝液 (pH 8.2) に懸濁し、25℃で 48 時間かくはんした。この懸濁液を網目の直径 32 μ m のステンレス金網でろ過し、残渣を 50 mM の塩化カルシウムを含む 10 % のエタノールで洗浄した。更にその残渣を 10 リットルの 50 mM 塩化カルシウムを含む 10 % のエタノール中に懸濁し、3 時間かくはん後、ステンレス金網でろ過、洗浄した。更にその残渣を同条件で懸濁後、16 時間かくはんし、直径 32 μ m のステンレス金網でろ過、洗浄した。

こうして得られたろ液及び洗浄液を集め、排除分子量 3000 のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、ろ過液と非ろ過液に分離した。

このろ過液をロータリーエバポレーターで約 3 リットルに濃縮後、遠心分離して上清を得た。得られた上清を排除分子量 300 の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、この溶液に 0.1 M となるように酢酸カルシウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清をあらかじめ 50 mM の酢酸カルシウムにより平衡化させた DEAE-セルロファイン (樹脂量 4 リットル) にかけて、50 mM の酢酸カルシウム及び 50 mM の塩化ナトリウムで充分洗浄後、50 mM ~ 800 mM の塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させた。この時の分取量は 1 本当たり 500 ml で行った。分取した画分をセルロースアセテート膜電気泳動法 [アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第 37 巻、第 197 ~ 202 頁 (1970)] により分析したところ塩化ナトリウム濃度が約 0.4 M で溶出される硫酸化糖 (フラクションナンバー 63 付近) が均一であった。

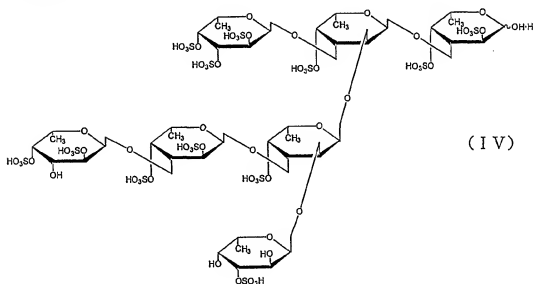
そこで、まずフラクションナンバー 63 の液を 150 ml に濃縮後、濃度が 4 M となるように塩化ナトリウムを添加し、あらかじめ 4 M の塩化ナトリウムにより平衡化したフェニルセルロファインカラム (樹脂量 200 ml) (生化学工業社製) にかけて、4 M の塩化ナトリウムにより充分洗浄した。非吸着性の硫酸化糖画分を集め、排除分子量 300 の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、脱塩

液 5 0 5 m l を得た。

得られた脱塩液のうち 4 0 m l を 1 0 % のエタノールを含む 0 . 2 M の塩化ナトリウムによって平衡化させたセルロフィン G C L - 9 0 のカラム (4 . 1 c m × 8 7 c m) にかけて、ゲルろ過を行った。分取は 1 フラクシオン当り 9 . 2 m l で行った。

全フラクシオンに対して総糖量の分析をフェノール硫酸法〔アナリティカルケミストリー (Analytical Chemistry)、第 2 8 巻、第 3 5 0 頁 (1 9 5 6) 〕により行った。

この結果、硫酸化糖は 1 つのピークを形成したので、そのピークの中央部分、フラクシオンナンバー 6 3 ~ 7 0 を集め、排除分子量 3 0 0 の膜を装着させた電気透析器により脱塩後、凍結乾燥し、1 1 2 m g の下記式 (I V) で表される化合物の乾燥品を得た。以下、該化合物を 7 - 1 2 S F d - F と称す。



(4) 製造例 2 で調製した I I I 画分 (F - フコイダン) の 2 . 5 % 水溶液 8 0 m l に 1 M トリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 6) を 1 6 m l 、 1 M C a C l ₂ 水溶液を 1 6 m l 、 4 M N a C l 水溶液を 2 4 m l 、実施例 3 - (1) で得た F - フコイダン分解酵素液を 8 m l 、蒸留水を 1 7 6 m l 添加し、 3 0 ° C で 3 時

間加熱した。この酵素処理F-フコイダン溶液を酵素処理F-フコイダンの最終濃度が2%になるようにロータリーエバポレーターで濃縮し、その後蒸留水中で透析操作を行い、2%酵素処理F-フコイダン水溶液を調製した。この試料をHPLC（カラム：SB802.5、カラム温度：35℃、移動相：50mM NaCl、流速：0.5ml/min、検出：RI ATT=8）で分析した。その結果、試料中の約40%が式（IV）記載の7-12SFd-Fであることが明らかになった。

製造例4

（1）乾燥ガゴメ昆布2kgを穴径1mmのスクリーンを装着したカッターミル（増幸産業社製）により破砕し、20リットルの80%エタノール中で25℃、3時間攪拌後ろ過、洗浄した。得られた残渣を50mMの塩化カルシウム、100mMの塩化ナトリウム、10%のエタノール、及び製造例3-（1）で調製したアルテロモナス sp. SN-1009（FERM BP-5747）F-フコイダン分解酵素を1U含む20リットルの30mMイミダゾール緩衝液（pH8.2）に懸濁し、25℃で2日攪拌し、次いで穴径32μmのステンレス金網でろ過し、洗浄した。得られた残渣を100mMの塩化ナトリウム、10%のエタノール、及び4gのアルギン酸リアーゼ（ナガセ生化学工業製）を含む40リットルのリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.6）に懸濁し、25℃、4日攪拌後、遠心分離し上清を得た。得られた上清中に含まれるアルギン酸の低分子化物を除去するため排除分子量10万のホロファイバーを装着した限外ろ過機により2リットルに濃縮後、10%のエタノールを含む100mMの塩化ナトリウムで溶液交換した。この溶液に等量の400mM酢酸カルシウムを添加攪拌後、遠心分離し、得られた上清を氷冷しながら、1Nの塩酸でpH2とした。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を1Nの水酸化ナトリウムによりpH8.0とした。この溶液を限外ろ過により1リットルに濃縮後、100mMの塩

化ナトリウムで溶液交換した。この時生じた沈殿は遠心分離により除去した。得られた上清中の疎水性物質を除去するため、上清に1Mとなるように塩化ナトリウムを加えて、1Mの塩化ナトリウムで平衡化した3リットルのフェニルセルロファインカラム（生化学工業製）にかけ、素通り画分を集めた。この画分を限外ろ過機により濃縮後、20mMの塩化ナトリウムで溶液交換し、凍結乾燥した。凍結乾燥物の重量は29.3gであった。

(2) 上記の凍結乾燥物15gを400mMの塩化ナトリウム及び国際公開第97/26896号パンフレット記載のフラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) を培養し、該培養物から得られたエンド型硫酸化多糖分解酵素（U-フコイダン分解酵素）を9U含む1.5リットルの50mMトリス塩酸緩衝液に溶解し、25℃で6日反応後、エバポレーターで約300mlに濃縮した。濃縮液を排除分子量3500の透析チューブに入れて徹底的に透析し、透析チューブ内に残った液を、50mMの塩化ナトリウムで平衡化した4リットルのDEAE-セルロファインA-800にかけ、50mM塩化ナトリウムで充分洗浄後、50～650mMの塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出を行った。更に同カラムを650mMの塩化ナトリウムで充分溶出させた。溶出画分のうち650mMの塩化ナトリウムで溶出した画分を硫酸化フコガラクトン画分として集め、排除分子量10万の限外ろ過機により濃縮後、10mMの塩化ナトリウムで溶液を置換し、凍結乾燥して硫酸化フコガラクトンの凍結乾燥物0.85gを得た。得られた硫酸化フコガラクトン（G-フコイダン）は、構成糖としてガラクトースとフコースを含有し、そのモル比は、約2:1であった。

(3) G-フコイダン分解酵素の生産のため、フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) をグルコース0.1%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH7.5からなる培地600mlを120℃、20分間殺菌した培地に接種し、24℃で23時間培養して種培養液とした。実施例4-(1)の方法で調製し

たガゴメ昆布由来のフコイダン画分 0.2%、ペプトン 2.0%、酵母エキス 0.01%、及び消泡剤（KM70、信越化学工業製）0.01%を含む人工海水（pH 7.5）からなる培地 20 リットルを 30 リットル容のジャーファーマンターにいれ 120℃で 20 分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600 ml を接種し、24℃で 23 時間、毎分 10 リットルの通気量と毎分 125 回転の攪拌速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を得た。

得られた菌体を、1200 ml の 0.4 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM のトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。得られた菌体抽出液を同じ緩衝液で充分透析し、遠心分離して上清を得た。得られた上清に終濃度が 90% 飽和となるように硫酸を添加し生じた沈殿を遠心分離して集めた。得られた沈殿を 150 ml の 50 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解させ、同じ緩衝液で充分透析し、遠心分離した。得られた上清を同じ緩衝液で平衡化した 500 mL の DEAE-セファロース FF（アマシャムファルマシア社製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、50 mM から 600 mM 塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、活性画分を集めた。

得られた活性画分を 0.1 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）で充分透析し、同じ緩衝液で平衡化した 100 mL の DEAE-セルロファイン A-800（生化学工業社製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、0.1 M から 0.4 M の塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させ、活性画分を集めた。得られた活性画分に 4 M となるように塩化ナトリウムを添加し、4 M の塩化ナトリウムを含む 10 mM のトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化した 20 mL のフェニルセルロファイン（生化学工業社製）のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、4 M から 1 M の塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出後、さらに 1 M の塩化ナトリウムを含む 10 mM のトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）で充分溶出させ、活性画分を集めた。得られた活性画分に 3 M となるよう

に塩化ナトリウムを添加し、3 Mの塩化ナトリウムを含む10 mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した10 mLのフェニルセルロファイン (生化学工業社製) のカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、3 Mから0.5 Mの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出後、さらに0.5 Mの塩化ナトリウムを含む10 mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で充分溶出させ、活性画分を集めた。このようにして得られた精製酵素をG-フコイダン分解酵素として用いた。

(4) 製造例4-(2) 記載のG-フコイダンに上記の精製G-フコイダン分解酵素を作用させ低分子化物を調製した。すなわち、1.94 gのG-フコイダンを0.2 Mの塩化ナトリウムを含む25 mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解後、186 mUのG-フコイダン分解酵素を加え、25℃で、6日間反応させた。反応液をエバポレーターにより80 mlに濃縮し、セルロファインGCL-1000 (生化学工業社製) のカラム (4×90 cm) による分子量分画を行った。分子量15,000以下の画分を集め、G-フコイダン酵素消化物画分とした。

(5) 上記G-フコイダン酵素消化物をエバポレーターで500 mlに濃縮後、電気透析装置により脱塩し、あらかじめ10 mMの塩化ナトリウムを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 8) で平衡化した1リットルのDEAE-セルロファインA-800 (生化学工業社製) のカラムにかけ、同緩衝液で洗浄後、10 mMから900 mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させた。溶出画分は61 mlずつ分取し、それぞれの糖含量をフェノール-硫酸法により測定した。270 mM付近の塩化ナトリウムで溶出される画分が糖含量のピークを形成していたので、それを集め270 mM溶出画分 (ロ) とした。

また上記の270 mM溶出画分 (ロ) に関しては、150 mMの塩化ナトリウムを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 8) と同じ電導率になるように水を添加し、あらかじめ150 mMの塩化ナトリウムを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 8) で平衡化した200 mlのDEAE-セルロフ

ァインA-800（生化学工業社製）のカラムにかけ、同緩衝液で洗浄後、150 mMから300 mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させた。溶出画分は12 mlずつ分取し、それぞれの糖含量をフェノール-硫酸法により測定した。160 mMから180 mM付近の塩化ナトリウムで溶出される画分を集め、スピードバック（サバントインストルメンツ社製；SAVANT Instruments Inc.）で2 mlに濃縮後、あらかじめ10%のエタノールで平衡化した200 mlのセルロファインGCL-25（生化学工業社製）のカラムにかけ、同溶液で溶出させた。溶出画分は2 mlずつ分取し、それぞれの糖含量をフェノール-硫酸法により測定した。糖含量がピークを形成している画分を集め、(D)とした。

上記画分(D)について電気透析装置により脱塩後、凍結乾燥し、糖組成及び質量を分析した。また、定法により重水で置換後NMR分析による構造解析を行った。

(D)の物性

分子量；1358

¹H-NMR (D₂O)

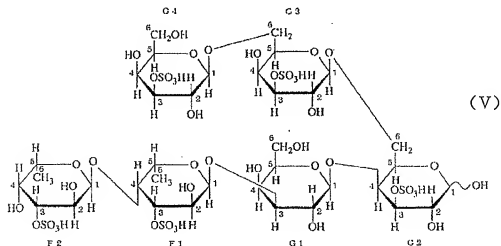
δ；5.19 (1H, d, J=4.3 Hz, F1-1-H), 4.93 (1H, d, J=3.7 Hz, F2-1-H), 4.62 (1H, HODと重複, G1-1-H), 4.59 (1H, HODと重複, G2-1-H), 4.54 (1H, d-d, J=10.6, 2.7 Hz, F1-3-H), 4.46 (1H, d, J=7.6 Hz, G3-1-H), 4.46 (1H, m, F2-3-H), 4.41 (1H, br-s, G2-4-H), 4.41 (1H, d, J=7.6 Hz, G4-1-H), 4.37 (1H, q, J=6.4 Hz, F2-5-H), 4.27 (1H, m, G2-3-H), 4.24 (1H, br-s, G3-4-H), 4.21 (1H, m, G3-3-H), 4.19 (1H, m, G4-3-H), 4.15 (1H, br-s, G4-4-H), 4.13 (1H, q, J=6.7 Hz, F1-5-H), 4.09 (1H, d, J=2.7 Hz, F1-4-H)

), 4.04 (1H, d, $J=2.8$ Hz, F2-4-H), 3.98 (1H, m, G2-6-H), 3.96 (1H, d-d, $J=10.6, 4.3$ Hz, F1-2-H), 3.93 (1H, m, G3-6-H), 3.88 (1H, br-s, G1-4-H), 3.86 (1H, m, G2-5-H), 3.81 (1H, m, G2-6-H), 3.81 (1H, m, F2-2-H), 3.80 (1H, m, G3-5-H), 3.80 (1H, m, G3-6-H), 3.66 (1H, m, G1-3-H), 3.65 (1H, m, G2-2-H), 3.64 (1H, m, G1-6-H), 3.64 (1H, m, G4-6-H), 3.61 (1H, m, G4-5-H), 3.58 (1H, m, G1-2-H), 3.56 (1H, m, G1-6-H), 3.56 (1H, m, G4-6-H), 3.55 (1H, m, G4-2-H), 3.54 (1H, m, G1-5-H), 3.54 (1H, m, G3-2-H), 1.20 (3H, d, $J=6.7$, F1-6-H), 1.14 (3H, d, $J=6.4$, F2-6-H)

糖組成 L-フコース : D-ガラクトース = 2 : 4 (モル比)

硫酸基 5分子

なお、 $^1\text{H-NMR}$ におけるピークの帰属の番号は下記式(V)の通りである。以下、該化合物を6-5SFD-Gと称する。

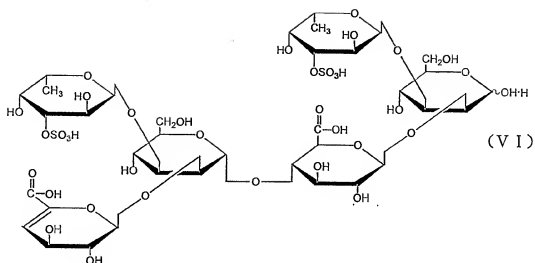


製造例 5

製造例 3 - (2) で調製した硫酸化多糖 120 g を 20 mM の塩化カルシウム、300 mM の塩化ナトリウム、10 % のエタノール、及び 10 U の製造例 3 - (1) で調製した F - フコイダン分解酵素を含む 8 リットルの 20 mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、25 °C で 3 日間かくはんし、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過装置を用い、上記緩衝液を添加しながら限外ろ過した。

限外ろ過内液に、製造例 4 - (2) 記載の U - フコイダン分解酵素を添加して、25 °C で 2 日間かくはんし、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過を行い、水を添加しながら限外ろ過した。

ろ液を集め、エバポレーターで 1.5 リットルに濃縮後、脱塩装置により完全に脱塩し、あらかじめ 30 mM の塩化ナトリウムを含む 5 mM のイミダゾール塩酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した 3 リットルの DEAE - セルロフアイン A - 800 のカラムにかけ、6 リットルの同緩衝液で洗浄後、30 mM から 500 mM の塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出を行った。溶出に要した液量は 48 リットルであった。溶出液は 180 ml ずつ分取し、その糖含量をフェノール - 硫酸法により測定した。また、232 nm における吸光度も同時に測定した。130 mM から 170 mM の塩化ナトリウム溶出画分が一つのピークを形成したので、これらの画分を集め、脱塩装置により脱塩後、凍結乾燥し、5.85 g のオリゴ糖を得た。このオリゴ糖は質量分析により、分子量 1128 であり NMR 分析により下記式 (VI) で表される化合物であることを確認した。以下、該化合物を 6 - 2 SFd - U と称す。



製造例 6

(1) D-(+)-グルコース 200 mg (1.1 mmol) をピリジン 10 ml に溶解し、室温にて Pyridine Sulfur Trioxide Complex (Pyr · SO₃ : 東京化成) 1.05 g (6.6 mmol) を添加した後、室温数分、60℃で1時間攪拌した。反応液を水で希釈し、飽和水酸化バリウム水溶液で pH を中性付近に調整してから減圧乾固した。得られた濃縮物に再度水を添加し再び減圧乾固した。この操作をもう一度繰り返した。得られた濃縮物に少量の水を添加し遠心で硫酸バリウムの沈澱を除去し、得られた上清を陽イオン交換カラム〔アンバーライト IRA-120 (Na⁺) (オルガノ)〕に供した。その結果得られたカラム素通り画分を減圧濃縮し硫酸化 D-(+)-グルコース ナトリウム塩 70 mg を調製した。

(2) L-フコース 500 mg (3.05 mmol) をピリジン 10 mL に溶解し、室温にて Pyr · SO₃ 2.33 g (14.6 mmol) を添加した後、室温数分、60℃1時間攪拌し、以下、製造例 6-(1) と同様の操作で、硫酸化フコースナトリウム塩を得た。

実施例1 抗原特異的細胞傷害活性を保持したCTLの継続培養方法

実施例1-1

(1) PBMCの分離および保存

HLA-A24 もしくはA2.1保有ヒト健康人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS(-)で2倍希釈し、Ficoll-paque(ファルマシア社製)上に重層後500g×20分間遠心した。中間層の末梢血単核細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FCS (JRH パイオサイエンス社製) / 10% ジメチルスルホキシド(SIGMA社製) からの保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。CTL誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10 μ g/ml DNase(Calbiochem社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

(2) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導はBednarekらの方法(Bednarek M. A. et al. (1991) J. Immunology, 147 4047-4053)を一部改変して実施した。すなわち、5%ヒトAB型血清、0.1mM 非必須アミノ酸、1mM ビルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(全てBio Whittaker社製)、10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1% ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)(以下5HRPMIと略す)に4 × 10⁶ cells/ml となるように実施例1-1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、24穴細胞培養プレート(Falcon社製)に1ml/ウェルずつまき、5%CO₂ 湿式インキュベーター内にて、37℃で1.5時間インキュベートし、プラスチック接着性の単球を分離した。その後、非接着性の細胞をRPMI1640培地を用いて回収し、レスポンド細胞として氷上保存した。分離した単球には、抗原ペプチドとしてインフルエンザウイルスタンパク質由来エプITO-ペプチド〔配列表の配列番号: 1に記載のヌクレオプロテイン由来HLA A24結合性ペプチド(F1uNPA24) R F Y I Q M C T E L もしくは配列表の配列番号: 2に記載のマトリックスプロテイン

ン由来HLA A2.1結合性ペプチド(FIuMPA2.1) G I L G F V F T L)
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および $\beta 2$ マイクログロブリン(スクリプス社製) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を
含む5HRPMIを0.5ml づつ添加し、2 時間室温にてインキュベート後、X 線照射(5
500R) して抗原提示細胞とした。各ウェルからペプチド液を吸引除去し、ウェル
をRPMI1640培地を用いて洗浄後、氷上保存しておいたレスポンダー細胞を $1\sim 2$
 $\times 10^6$ cells/mlとなるよう5HRPMIに懸濁し、1ml/ウェルづつ抗原提示細胞上に添
加した。このとき、試料を終濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。対照として、
試料を添加しない群を設定した。試料としては、製造例1で調製したガゴメ昆布
由来フコイダンをを用いた。プレートを5% CO_2 中、37℃で培養した。培養開
始後2 日目に、IL-2 (塩野義製薬社製)60U/ml と10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最初に添加した
試料と同じ試料を含む5HRPMI 1ml (対照は、IL-2 のみ含有)を各ウェルに添加
、また5 日目には培養上清を半分除去後同様のIL-2 および試料含有培地(対
照はIL-2 のみ含有)を1ml づつ添加した。7 日目に上記と同様にして抗原提示
細胞を調製したあと、1 週間培養したレスポンダー細胞を $1\sim 2 \times 10^6$ cells/ml
となるように5HRPMIに懸濁し、上記と同様にして調製した抗原提示細胞上に1ml/
ウェルづつ添加し、再刺激した。このとき、試料を終濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように
添加した(対照は、無添加)。再刺激後2 日目に、IL-2 60U/mlおよび10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
の試料を含む(対照は、IL-2 のみ含有) 5HRPMI1mlを各ウェルに添加、ま
た5 日目には培養上清を半分除去後、除去前と同じ内容の培地を1ml づつ添加し
、さらに培養を2 日続け、CTLを誘導した。

(3) CTL細胞傷害活性の測定

実施例1-1-(2)で調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は
、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法(Rudolf Lichtenfels et al. J. immu
nological methods 172 (1994) 227-239)にて評価した。

一晚エпитーブペプチドと共培養、もしくはエпитーブペプチド非存在下で培
養したHLA-A24 またはA2.1保持EBV トランスフォームB 細胞(TISIまたは221A2.

1) を 1×10^5 cells/ml となるよう 5 % FCS (JRH バイオサイエンシズ社製) を含む RPMI1640 培地に懸濁後、終濃度 $25 \mu\text{M}$ となるように Calcein-AM (ドータイト社製) を添加し、 37°C で 1 時間培養した。細胞を Calcein-AM を含まない培地にて洗浄後 20 倍量の K562 細胞と混合し、Calcein 標識標的細胞とした。なお、K562 細胞はレスポンダー細胞中に混入する NK 細胞による非特異的傷害活性を排除するために用いた。

実施例 1-1-(2) で調製したメモリー CTL をエフェクター細胞として $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ cells/ml となるように 5HRPMI で段階希釈後、96 穴細胞培養プレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注しておき、これらに 1×10^5 /ml に調製した Calcein 標識標的細胞を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを $400\text{g} \times 1$ 分間遠心後、 37°C の湿式 CO_2 インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。

4 時間後、各ウェルから培養上清 $100 \mu\text{l}$ を採取し、蛍光プレートリーダー ($485\text{nm} / 538\text{nm}$) によって培養上清中に放出された calcein 量を測定した。特異的細胞傷害活性は以下の式 1 にしたがって算出した。

〔式 1〕

特異的細胞傷害活性 (%) =

$$\left[\left(\text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出量} \right) / \left(\text{最大放出量} - \text{最小放出量} \right) \right] \times 100$$

上式において最小放出量は標的細胞および K562 細胞のみ含有するウェルの calcein 放出量であり、標的細胞からの calcein 自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤トリトン X-100 (ナカライテスク社製) を加えて細胞を完全破壊した際の calcein 放出量を示している。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差は無かった。

(4) CTLの継続培養

実施例1-1-(2)で調製し、実施例1-1-(3)でエピトープペプチド特異的細胞傷害活性を確認したCTLを5HRPMIで洗浄後、30U / mlのIL-2を含む5HRPMI中でさらに10～14日間継続的に培養した。その際、CTL誘導時に試料を添加した群にはCTL誘導時と同じ試料を同濃度で培地に添加して培養した。また、CTL誘導時に試料を添加していない対照は、引き続き試料を添加せずに培養を行った。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、2～3日毎に培養上清を半分除去後、除去前と同じ組成の培地を1mlずつ添加した。継続培養後、実施例1-1-(3)と同様の方法によりCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表1に示す。なお、表中においてE/T比は標的細胞数(T)に対するエフェクター細胞数(E)の比を、ペプチド付加は標的細胞に対するペプチド付加の有無を意味する。

表 1

ペプチド	試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)		
		CTL 誘導時	IL-2 培養時		1	E/T比 3	10
FluMPA 2.1	対照	—	—	—	N.T.	N.T.	0
		—	—	+	N.T.	N.T.	0
					0.7	E/T比 2.2	7
	ガゴメ昆布 由来 フコイダン	+	+	—	0	0	0
		+	+	+	22.9	52.7	80.6
FluNPA 24	対照	—	—	—	0	0	11.8
		—	—	+	5.7	21	65.1
	ガゴメ昆布 由来 フコイダン	+	+	—	1.6	0	7.5
		+	+	+	28.6	66.9	96.9

(N.T. は評価していないことを示す。)

その結果、CTL誘導時と継続培養時の両段階で試料を添加した群においては、10～14日間の継続培養後においてもその活性を高く維持していた。しかし、一方で、CTL誘導中および継続培養中のどちらにもガゴメ昆布由来フコイダンを添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、ガゴメ昆布由来フコイダンをCTL誘導時と継続培養時に添加することにより、継続培養時にペプチド等による刺激を付加することなく、抗原特異的な細胞傷害活性を保持した状態のCTLの継続培養が可能であることが明らかになった。

実施例 1-2

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)と同様の方法で、PBMCの分離を行い、保存しておいたPBMCを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例 1 で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例 2 で調製した I I I 画分 (F-フコイダン) と I I 画分 (U-フコイダン)、製造例 3 で調製した 7-12SFd-F をそれぞれ終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地に添加した。対照として試料を添加しない群を設定した。

こうして調製した誘導開始後 14 日目の CTL の細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、抗原特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTL の継続培養

実施例 1-2-(1)で調製した CTL を実施例 1-1-(4)と同様の方法で、さらに 10~14 日間継続的に培養した。この際、試料として、実施例 1-2-(1)で CTL 誘導時に添加した試料をそれぞれ終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地に添加した。また、CTL 誘導時に試料を添加していない対照は、引き続き試料を添加せずに培養を行った。継続培養後、実施例 1-1-(3)と同様の方法により CTL の特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表 2 に示す。

表 2

ペプチド	試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)		
		CTL 誘導時	IL-2 培養時		3	E/T比 10	30
FluMPA 2.1	対照	—	—	—	4.6	5.0	13.1
		—	—	+	11.0	23.4	47.9
	ガゴメ昆布 由来 フコイダン	+	+	—	5.9	4.9	12.3
		+	+	+	53.3	86.0	100.9
	F-フコイ ダン	+	+	—	2.1	2.4	7.2
		+	+	+	41.1	66.8	82.8
	U-フコイ ダン	+	+	—	1.6	4.1	9.2
		+	+	+	46.3	75.2	92.3
	7-12SF d-F	+	+	—	0.3	2.2	11.7
		+	+	+	12.0	37.9	60.7

この結果、CTL誘導時と継続培養時の両段階でこれらの試料を添加した群は、どの群においても、10～14日間の継続培養後にも、その活性を高く維持していた。しかし、一方で、CTL誘導時および継続培養時のどちらにも試料を添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、ガゴメ昆布由来フコイダン、F-フコイダン、U-フコイダンまたは7-12SF d-FをCTL誘導時と継続培養時に添加することにより、ペプチド等による刺激を付加することなく、抗原特異的な細胞傷害活性を保持した状態でCTLの継続培養が可能であることが明らかになった。

実施例1-3

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-1-(1)に記載の方法で分離、保存しておいたPBMcを用い、実施例1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTL

の誘導を行った。その際、試料として、L. M. W. ヘパリン(商品名 Ardeparin sodium; CELSUS LABORATORIES INC. 社製)、非膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、製造例 6-(1)で調製した硫酸化グルコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸Aナトリウム(生化学工業社製)を終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように培地に添加した。また、対照として試料を添加しない群を設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの継続培養

実施例1-3-(1)で調製したCTLを実施例1-1-(4)と同様の方法で、さらに10~14日間継続的に培養した。この際、実施例1-3-(1)でCTL誘導時に添加した試料と同じ試料をそれぞれ終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように培地に添加した。また、CTL誘導時に試料を添加していない対照は、引き続き試料を添加せずに培養を行った。継続培養後、実施例1-1-(3)と同様の方法によりCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表3に示す。

表 3

試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)		
	CTL 誘導時	IL-2 培養時		1	E/T比 3	10
対照	—	—	—	17.4	26.5	35.2
	—	—	+	28.0	43.8	63.7
L. M. W. ヘパリン	+	+	—		11.7	14.2
	+	+	+		49.0	71.7
非膨潤性アルギン酸	+	+	—	12.9	24.8	14.0
	+	+	+	28.1	52.7	77.1
膨潤性アルギン酸	+	+	—	12.5	26.5	22.2
	+	+	+	39.8	75.3	86.9
硫酸化グルコース	+	+	—	14.3	27.8	21.0
	+	+	+	34.0	67.8	92.1
コンドロイチン硫酸A	+	+	—			21.1
	+	+	+			75.5

この結果、CTL誘導時と継続培養時の両段階でこれらの試料を添加した群は、どの群においても、継続培養後にも、その活性を高く維持していた。しかし、CTL誘導時および継続培養時のどちらにも試料を添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、フコイダン同様、硫酸化多糖であるヘパリン、コンドロイチン硫酸Aナトリウムを、CTL誘導時と継続培養時に添加することにより、ペプチド等による刺激を付加することなく、抗原特異的な細胞傷害活性を保持した状態でCTLの継続培養が可能であることが明らかになった。つまり、フコイダン以外の硫酸化多糖にも同様の活性があることが明らかになった。さらに、硫酸化多糖以外でも、硫酸化単糖である硫酸化グルコースナトリウム塩にもフコイダン同様の活性があることから、硫酸化された糖はその大きさには関係無く細胞傷害活性維持効果を有していることが明らかになった。一方、硫酸化糖ではない非膨潤

性および膨潤性アルギン酸にもフコイタン同様の活性があることが示されたことより、上記の活性は硫酸化された糖に特有のものではなく、酸性糖であれば糖の種類には影響されずに細胞傷害活性維持効果を発現することが明らかになった。

実施例 1-4

(1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存しておいたPBMcを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、ペクチン酸(ナカライテスク社製)、製造例 6-(2)で調製した硫酸化フコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸Bナトリウム(生化学工業社製)をそれぞれ終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。対照として試料を添加しない群を設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの継続培養

実施例 1-4-(1)で調製したCTLを実施例 1-1-(4)と同様の方法で、さらに10~14日間継続的に培養した。この際、実施例 1-4-(1)でCTL誘導時に添加した試料と同じ試料をそれぞれ終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように培地に添加した。また、CTL誘導時に試料を添加していない対照は、引き続き試料を添加せずに培養を行った。継続培養後、実施例 1-1-(3)と同様の方法によりCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表4に示す。

表 4

試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)		
	CTL 誘導時	IL-2 培養時		2.5	E/T比 5	10
対照	—	—	—	0.5	4.0	N. T.
	—	—	+	10.9	19.7	N. T.
ペクチン酸	+	+	—	3.4	5.5	N. T.
	+	+	+	32.0	49.4	N. T.
硫酸化フコース	+	+	—	0	0	0.2
	+	+	+	17.6	36.6	55.3
コンドロイチン硫酸 B	+	+	—	0	0	0.8
	+	+	+	28.1	38.1	60.7

(N. T. は評価していないことを示す。)

この結果、CTL誘導時と継続培養時の両段階でこれらの試料を添加した群は、どの群においても、継続培養後にも、その活性を高く維持していた。しかし、CTL誘導時および継続培養時のどちらにも試料を添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、硫酸化多糖であるコンドロイチン硫酸 B ナトリウム、硫酸化単糖である硫酸化フコースナトリウム塩、酸性多糖であるペクチン酸がいずれも細胞傷害活性維持効果を有していることが明らかになった。

実施例 1-5

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1) に記載の方法で分離、保存しておいたPBMcを用い、実施例 1-1-(2) と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、上記の実施例に用いられたような試料は全く添加しなかった。抗原ペプチドにはFluMPA2.1 を用いた。

こうして調製した誘導開始後 14 日目のCTLの細胞傷害活性を、実施例 1-

1-(3)と同様の方法にて評価した。

(2) CTLの継続培養

実施例1-5-(1)で調製したCTLを実施例1-1-(4)と同様の方法で、さらに10~14日間継続的に培養した。この際、試料として、製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例2で調製したIII画分(F-フコイダン)、II画分(U-フコイダン)、L. M. W. ヘパリン(商品名 Ardeparin sodium; CELSUS LABORATORIES INC. 社製)、ペクチン酸(ナカライテスク社製)、非膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、製造例6-(1)で調製した硫酸化グルコースナトリウム塩、製造例6-(2)で調製した硫酸化フコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸Bナトリウム(生化学工業社製)をそれぞれ終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。継続培養後、実施例1-1-(3)と同様の方法によりCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表5と6に示す。

表 5

試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)		
	CTL 誘導時	IL-2 培養時		E/T比		
				1	3	10
対照	—	—	—	0	1.6	4.9
	—	—	+	5.6	7.0	13.7
ガゴメ昆布由来 フコイダン	—	+	—	0	0	3.1
	—	+	+	7.0	11.0	27.9
F-フコイダン	—	+	—		0	1.6
	—	+	+		7.4	20.4
U-フコイダン	—	+	—		0	0
	—	+	+		7.6	17.5
L. M. W. ヘパリン	—	+	—			0
	—	+	+			18.3
ペクチン酸	—	+	—			0
	—	+	+			16.5

表 6

試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性（％）		
	CTL 誘導時	IL-2 培養時		E/T比		
				1	3	10
対照	—	—	—	0	1.6	4.9
	—	—	+	5.6	7.0	13.7
非膨潤性アルギン酸	—	+	—	3.9	4.6	6.1
	—	+	+	9.5	13.8	24.9
膨潤性アルギン酸	—	+	—	3.3	1.3	8.8
	—	+	+	12.6	18.7	35.6
硫酸化グルコース	—	+	—	2.2	2.4	7.5
	—	+	+	8.1	17.8	32.5
硫酸化フコース	—	+	—	0	0.4	3.3
	—	+	+	8.9	12.6	26.4
コンドロイチン硫酸 B	—	+	—	N.T.	N.T.	4.6
	—	+	+	N.T.	N.T.	24.0

(N. T. は評価していないことを示す。)

その結果、CTL誘導時に試料を添加しなくても、継続培養の段階で上記の試料を添加した群は、どの群においても、継続培養後にも、その活性を高く維持していた。しかし、継続培養中に試料を添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、ガゴメ昆布由来フコイダン、F-フコイダン、U-フコイダン、L. M. W. ヘパリン、ペクチン酸（ナカライテスク社製）、非膨潤性アルギン酸、膨潤性アルギン酸、硫酸化グルコースナトリウム塩、硫酸化フコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸 B ナトリウムを、継続培養時に添加することにより、ペプチド等による刺激を付加することなく、抗原特異的な細胞傷害活性を保持した状態でCTLの継続培養が可能であることが明らかになった。つまり、継続培養時にのみ酸性糖を添加することにより、抗原特異的な細胞傷害活性を保持したCTLを継続培養することが可能であることが明らかになった。

実施例 1-6

(1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存しておいたPBMcを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例 1 で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例 2 で調製した I I I 画分 (F-フコイダン)、I I 画分 (U-フコイダン)を終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるように培地に添加した。抗原ペプチドには Pl uMPA2.1 を用いた。

こうして調製した誘導開始後 14 日目の CTL の細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの継続培養

実施例 1-6-(1)で調製した CTL を実施例 1-1-(4)と同様の方法で、さらに 10~14 日間継続的に培養した。この際、実施例 1-6-(1)で CTL 誘導時に添加した試料と同じ試料をそれぞれ終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した群と添加しない群を設定した。また、CTL 誘導時に試料を添加していない対照は、引き続き試料を添加せずに培養を行った。継続培養後、実施例 1-1-(3)と同様の方法により CTL の特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表 7 に示す。

表 7

試料	試料添加		ペプチド 付加	細胞傷害活性（％）		
	CTL 誘導時	IL-2 培養時		E/T比		
				2	10	30
対照	—	—	—	4.6	5.0	13.1
	—	—	+	11.0	23.4	47.9
ガゴメ昆布由来 フコイダン	+	+	—	5.9	4.9	12.3
	+	+	+	53.3	86.0	100.9
	+	—	—	0	0	4.5
	+	—	+	46.0	78.5	98.7
F－フコイダン	+	+	—	2.1	2.4	7.2
	+	+	+	41.5	66.8	82.8
	+	—	—	0	0	3.2
	+	—	+	37.6	63.5	86.3
U－フコイダン	+	+	—	1.6	4.1	9.2
	+	+	+	46.3	75.2	92.3
	+	—	—	0	0	4.5
	+	—	+	43.5	71.9	91.1

この結果、CTL誘導時に、これらの試料を添加した群においては、継続培養時の試料の添加の有無に関わらず、継続培養後においてもその活性を高く維持していた。一方で、CTL誘導時および継続培養時のどちらにもこれらの試料（ガゴメ昆布由来フコイダン）を添加しなかった群（対照）では、その活性を明らかに低下させていた。

このことより、ガゴメ昆布由来フコイダン等の酸性糖をCTL誘導時に添加し、継続培養時には添加しない場合にも、ペプチド等による刺激を付加することなく、抗原特異的な細胞傷害活性を保持した状態でCTLの継続培養が可能であることが明らかになった。

以上の結果より、CTLの誘導時と継続培養時に酸性糖を添加することにより、CTLの特異的な細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLを継続培養できることが明らかになった。さらに、酸性糖をCTLの誘導時、あるいは、継続

培養時どちらか一方に添加するのみでも、CTLの特異的細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLを継続培養できることが明らかになった。

実施例2 特異的細胞傷害活性を保持したCTLの拡大培養

実施例2-1

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMcを用い、実施例1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを終濃度10 μ g/mlとなるように培地に添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例2-1-(1)で調製したCTLを5HRPMIで洗浄後、5 $\times 10^4$ cells/mlに調製した。一方、実施例1-1-(1)と同様の方法により採取したHLA-A24およびA2.1 非保持allogenic PBMcをX線照射(3300R)し、培地で洗浄後5 $\times 10^6$ cells/mlに調製した。これらのCTL(2.5 $\times 10^4$ cells)とallogenic PBMc(1.25 $\times 10^7$ cells)を10mlの5HRPMIに懸濁し、さらに終濃度50ng/mlの抗CD3抗体(ヤンセン協和社製)を加えて12.5cm²のフラスコ(ファルコン社製)に入れ、37℃湿式CO₂インキュベーター中で14日間培養した。この際、試料として終濃度10 μ g/mlのガゴメ昆布由来フコイダンを添加する群と添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培

養上清を半分除去後、I L-2 60U/ml を含む5HRPMI 5ml を各フラスコに添加した。この際、試料添加群の培地には同濃度のガゴメ昆布由来フコイタンを添加した。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表8に示す。拡大増殖率(×倍率)は、拡大培養後の細胞数を拡大培養前の細胞数で除して求めた。

表 8

ペプチド	試料	試料添加		拡大増殖率	ペプチド付加	細胞傷害活性 (%)			
		CTL誘導時	拡大培養時			E/T比			
						1	3	10	30
FluMPA 2,1	対照	-	-	×494	-	2.5	1.2	2.0	8.4
		-	-	×494	+	5.2	14.7	38.8	70.3
	ガゴメ昆布 由来フコイ タン	+	+	×513	-	1.6	3.2	5.4	7.8
		+	+	×513	+	22.2	47.4	87.0	108.3
		+	-	×694	-	2.5	3.2	7.2	18.5
		+	-	×694	+	21.0	44.7	84.2	102.8
		-	+	×488	-	2.1	2.2	5.8	7.8
		-	+	×488	+	10.5	26.4	62.3	83.8
FluNPA 24	対照	-	-	×316	-	13.0	7.3		N.T.
		-	-	×316	+	22.7	50.8		N.T.
	ガゴメ昆布 由来フコイ タン	+	+	×360	-	0	0		N.T.
		+	+	×360	+	35.7	76.7		N.T.
		+	-	×338	-	4.8	9.4		N.T.
		+	-	×338	+	48.6	85.1		N.T.
		-	+	×448	-	2.9	0		N.T.
		-	+	×448	+	26.7	76.2		N.T.

(N. T. は評価していないことを示す。)

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にガゴメ昆布由来フコイタンを添加した群においては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもガゴメ昆布由来フコイタンを添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。また、CTL誘導時にガゴメ昆布由来フコイタンを添加せず、抗CD3抗体

による拡大培養時にガゴメ昆布由来フコイダンを添加した群、ならびにCTL誘導時にガゴメ昆布由来フコイダンを添加し、拡大培養時にはこれを添加しなかった群においても特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保存した状態でCTLを拡大培養することができた。つまり、少なくともCTL誘導時または拡大培養時のいずれかにガゴメ昆布由来フコイダンを添加することによって、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLを拡大培養することが可能になることが明らかになった。

実施例 2-2

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMcを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例 1 で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例 2 で調製した I I I 画分 (F-フコイダン)、I I 画分 (U-フコイダン) を、それぞれ終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後 14 日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例 2-2-(1)で調製したCTLを用い、実施例 2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例 2-2-(1)でのCTL誘導の際に添加した試料と同じ試料をそれぞれ終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるように添加する群と誘導時から試料を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始 1 日目に終濃度 120U/ml の IL-2

を添加、さらに培養開始後4日目以降は2～3日ごとに培養上清を半分除去後、
 IL-2 60U/ml および試料10 μ g/mlを含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加し
 た。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添
 加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の
 方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表9に示す。

表 9

試料	試料添加		拡大 増殖率	ペプチド 付加	細胞傷害活性(%)
	CTL 誘導時	拡大 培養時			E/T比 10
対照	—	—	×332	—	3.1
	—	—	×332	+	59.7
ガゴメ昆布由来 フコイダン	+	+	×388	—	2.4
	+	+	×388	+	85.2
F-フコイダン	+	+	×340	—	2.1
	+	+	×340	+	77.7
U-フコイダン	+	+	×290	—	1.2
	+	+	×290	+	81.6

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にこれらの試料を添加した群におい
 ては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持
 していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもこれらの試料を添
 加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、フコイダン
 の構造、種類に関係無く、フコイタンをCTL誘導時と拡大培養時に添加するこ
 とにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大
 培養が可能になることが明らかになった。

実施例 2-3

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPEMCを用い、実施例1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例3で調製した7-12SFd-Fを、終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例2-3-(1)で調製したCTLを用い、実施例2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例2-3-(1)でのCTL誘導の際に添加した試料と同じ試料を終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加する群と誘導時から試料を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 $120\text{U}/\text{ml}$ のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2〜3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 $60\text{U}/\text{ml}$ および7-12SFd-F $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表10に示す。

表 10

試料	試料添加		拡大 培養率	ペプチド 付加	細胞傷害活性（％）	
	CTL 誘導時	拡大 培養時			E/T比	
					3	10
対照	—	—	×260	—	2.5	5.0
	—	—	×260	+	54.2	84.3
7-12S	+	+	×178	—	2.8	0
Fd-F	+	+	×178	+	67.0	93.7

その結果、CTL誘導時および拡大培養時に7-12SFd-Fを添加した群においては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにも試料を添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、フコイダンのような高分子の硫酸多糖だけでなく、F-フコイダンの構成単位である7-12SFd-Fのように分子量が小さい硫酸化糖でも、CTL誘導時と拡大培養時に添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 2-4

(1) 抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMcを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、L. M. W. ヘパリン(商品名 Ardeparin sodium; CELSUS LABORATORIES INC. 社製)、ペクチン酸(ナカライテスク社製)、非膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、製造例 6-(1)で調製した硫酸化グルコースナトリウム塩、製造例 6-(2)で調製した硫酸化フコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸Aナトリウム(生

化学工業社製)、コンドロイチン硫酸Bナトリウム(生化学工業社製)を、それぞれ終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluNPA24を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例2-4-(1)で調製したCTLを用い、実施例2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例2-4-(1)でのCTL誘導の際に添加した試料と同じ試料をそれぞれ終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加する群と誘導時から試料を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 120U/ml のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml および試料 $10\mu\text{g/ml}$ を含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表11に示す。

表 1 1

試料	試料添加		拡大増殖率	ペプチド付加	細胞傷害活性（％）	
	CTL誘導時	拡大培養時			E/T比	
					3	10
対照	—	—	×274	—	17.0	32.2
	—	—	×274	+	44.2	66.0
L. M. W. ヘパリン	+	+	×240	—	5.2	19.6
	+	+	×240	+	56.4	92.9
ペクチン酸	+	+	×160	—	11.6	7.3
	+	+	×160	+	47.0	69.8
非膨潤性アルギン酸	+	+	×220	—	26.2	26.8
	+	+	×220	+	63.5	81.4
膨潤性アルギン酸	+	+	×176	—	14.3	21.3
	+	+	×176	+	65.0	101.6
硫酸化グルコース	+	+	×220	—	10.3	25.6
	+	+	×220	+	62.3	127.4
硫酸化フコース	+	+	×240	—		23.3
	+	+	×240	+		70.2
コンドロイチン硫酸A	+	+	×280	—	0	5.3
	+	+	×280	+	56.7	89.0
コンドロイチン硫酸B	+	+	×178	—	1.0	10.7
	+	+	×178	+	57.8	98.2

この結果、CTL誘導時および拡大培養時にこれらの試料を添加した群のCTLは、いずれも14日間の拡大培養後に特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにも試料を添加しなかった群では、その活性は明らかに低下していた。つまり、硫酸化糖だけでなく、糖の種類、修飾等に関係無く、酸性糖をCTL誘導時と拡大培養時に添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態でCTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 2-5

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMcを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、上記実施例に使用されたような試料は全く添加しなかった。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後 14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。

(2) CTLの拡大培養

実施例 2-5-(1)で調製したCTLを用い、実施例 2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、最終濃度が10 μ g/mlになるように試料を添加する群と、試料を添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml および試料10 μ g/mlを含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。試料としては、製造例2で調製したIII画分(F-フコイダン)を用いた。拡大培養開始後、14日目に実施例 1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表12に示す。

表 1 2

試料	試料添加		拡大 増殖率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性 (%)			
	CTL 誘導時	拡大 培養時			E/T比			
					1	3	10	30
対照	—	—	×393	—	1.5	1.0	3.1	5.9
	—	—	×393	+	3.8	15.7	36.7	60.2
F-フコイダン	—	+	×475	—			0	1.7
	—	+	×475	+			40.7	76.3

この結果、拡大培養時にF-フコイダンを添加した群のCTLは、14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにも試料を添加しなかった群では、その活性は明らかに低下していた。つまり、F-フコイダンを誘導時からでなく、拡大培養時だけに添加しても、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態でCTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 2-6

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、試料は、全く添加しなかった。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。

(2) CTLの拡大培養

実施例 2-6-(1)で調製したCTLを用い、実施例 2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、終濃度が10μg/mlになるように

試料を添加する群と、試料を添加しない群を設定した。この間ベブチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1 日目に終濃度120U/ml の I L - 2 を添加、さらに培養開始後4 日目以降は2 ～3 日ごとに培養上清を半分除去後、I L - 2 60U/ml および試料10 μ g/mlを含む5HRPMI 5ml を各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも試料の添加は行わなかった。試料としては、製造例1 で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例2 で調製したII画分 (U-フコイダン)、製造例3 で調製した7-12SFd-F、L. M. W. ヘパリン(商品名 Ardeparin sodium; CELSUS LABORATORIES INC. 社製)、ペクチン酸(ナカライテスク社製)、非膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、膨潤性アルギン酸(和光純薬社製)、製造例6-(1) で調製した硫酸化グルコースナトリウム塩、製造例6-(2) で調製した硫酸化フコースナトリウム塩、コンドロイチン硫酸Aナトリウム(生化学工業社製)、コンドロイチン硫酸Bナトリウム(生化学工業社製)を用いた。拡大培養開始後、14 日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表13と14に示す。

表 1 3

試料	試料添加		拡大 増殖率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性 (%)			
	CTL 誘導時	拡大 培養時			1	3	E/T比 10	30
対照	—	—	×403	—	0.8	1.9	4.5	9.9
	—	—	×403	+	6.5	16.0	31.9	53.2
ガゴメ昆布由来 フコイダン	—	+	×425	—	0	0	3.9	12.3
	—	+	×425	+	13.1	18.3	40.3	72.4
U-フコイダン	—	+	×358	—	0	0	2.9	5.3
	—	+	×358	+	13.2	25.9	45.6	69.4
7-12S Fd-F	—	+	×310	—	2.7	0	1.0	3.5
	—	+	×310	+	14.1	20.1	41.7	64.6
L. M. W. ヘパリン	—	+	×353	—	1.4	0	0.6	2.5
	—	+	×353	+	11.3	22.2	43.9	71.2
ペクチン酸	—	+	×350	—	2.3	4.1	8.2	15.9
	—	+	×350	+	18.2	33.3	64.2	87.8

表 1 4

試料	試料添加		拡大増殖率	ペプチド付加	細胞傷害活性（％）			
	CTL誘導時	拡大培養時			E/T比			
					1	3	10	30
対照	—	—	×403	—	0.8	1.9	4.5	9.9
	—	—	×403	+	6.5	16.0	31.9	53.2
非膨潤性アルギン酸	—	+	×335	—	0.5	5.2	6.5	14.4
	—	+	×335	+	13.5	24.1	50.4	76.0
膨潤性アルギン酸	—	+	×378	—	0.1	0	2.1	10.6
	—	+	×378	+	15.4	22.0	47.8	81.7
硫酸化グルコース	—	+	×343	—	2.8	0	0	3.6
	—	+	×343	+	11.0	18.0	39.5	59.0
硫酸化フコース	—	+	×448	—			0	1.3
	—	+	×448	+			32.5	64.9
コンドロイチン硫酸A	—	+	×383	—	6.3	5.6	7.5	18.8
	—	+	×383	+	8.0	18.7	36.6	67.6
コンドロイチン硫酸B	—	+	×383	—	3.9	4.4	8.3	11.8
	—	+	×383	+	15.2	27.2	48.1	76.2

この結果、拡大培養時にこれらの試料を添加した群のCTLは、いずれも14日間の拡大培養後において特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにも試料を添加しなかった群では、その活性は明らかに低下していた。つまり、酸性糖を誘導時からでなく、拡大培養時だけに添加しても、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 2-7

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCMを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

を行った。その際、試料を終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。試料としては、製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダン、製造例2で調製したII画分（F-フコイダン）、II画分（U-フコイダン）、製造例3で調製した7-12SFd-F、L、M、W、ヘパリン（商品名 Ardeparin sodium; CELSUS LABORATORIES INC. 社製）を用いた。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-（3）と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無、試料の違いによる細胞傷害活性の差は無かった。

（2） CTLの拡大培養

実施例2-7-（1）で調製したCTLを用い、実施例2-1-（2）と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例2-7-（1）でのCTL誘導の際に添加した試料と同じ試料を添加する群と添加しない群、及び、誘導時から試料を全く添加しない対照群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 120U/ml のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2～3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml および試料 $10\mu\text{g/ml}$ を含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-（3）と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表15に示す。

表 15

試料	試料添加		拡大 増殖率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性 (%)			
	CTL 誘導時	拡大 培養時			1	3	E/T比 10	30
対照	—	—	×393	—	1.5	1.0	3.1	5.9
	—	—	×393	+	3.6	15.7	36.7	60.2
ガゴメ昆布 由来 フコイダン	+	+	×310	—	2.5	3.8	0	2.0
	+	+	×310	+	15.1	30.9	76.7	77.9
	+	—	×166	—	5.6	2.4	5.9	12.2
	+	—	×166	+	15.3	30.2	65.2	88.3
F-フコイダン	+	+	×278	—	1.5	1.2	4.4	1.3
	+	+	×310	+	9.2	21.2	41.9	65.4
	+	—	×175	—	2.2	0.8	1.2	2.4
	+	—	×175	+	6.7	16.3	47.3	74.4
U-フコイダン	+	+	×214	—				3.4
	+	+	×214	+				66.7
	+	—	×173	—	7.1	8.9	8.8	11.5
	+	—	×173	+	10.6	23.2	46.0	77.0
7-12SFd -F	+	+	×258	—	0	0	0	1.6
	+	+	×258	+	9.4	23.4	44.2	82.1
	+	—	×283	—	6.7	6.5	9.3	9.8
	+	—	×283	+	14.0	34.6	50.4	83.5
L. M. W. ヘパリン	+	+	×243	—	5.6	2.5	1.1	0.9
	+	+	×243	+	16.3	22.7	43.9	72.8
	+	—	×253	—	5.2	4.5	6.6	7.0
	+	—	×253	+	12.5	26.9	57.8	83.7

その結果、CTL誘導時と拡大培養時の両方でこれらの試料を添加した群、CTL誘導時だけに、これらの試料を添加した群のいずれにおいても、14日間の拡大培養後のCTLは特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもガゴメ昆布由来フコイタンを添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、誘導時に酸性糖を添加すれば、拡大培養時に酸性糖を添加の有無に関係なく、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかにな

った。

以上の結果より、CTLの誘導時と拡大培養時のいずれかまたは両方に酸性糖を添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例3 REM法との比較及びREM法との組み合わせ

実施例3-1

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、試料として、製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。

(2) CTLの拡大培養

実施例3-1-(1)で調製したCTLを5HRPMIで洗浄後、 $5\times 10^4\text{cells/ml}$ に調製した。一方、実施例1-1-(1)と同様に採取したHLA-A24およびA2.1非保持allogenic PBMCをX線照射(3300R)し培地で洗浄後 $5\times 10^6\text{cells/ml}$ に調製した。これらのCTL($2.5\times 10^4\text{cells}$)とallogenic PBMC($1.25\times 10^7\text{cells}$)を10mlの5HRPMIに懸濁し、さらに終濃度50ng/mlの抗CD3抗体(ヤンセン協和社製)を加えて12.5cm²のフラスコ(ファルコン社製)に入れ、37℃の湿式CO₂インキュベーター中で14日間培養した。この際、試料として終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加する群と添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後

4日目以降は2〜3日ごとに培養上清を半分除去後、 $1\text{ L}-2\ 60\text{U/ml}$ を含む5H RPMI 5 ml を各フラスコに添加した。この際、試料添加群の培地には終濃度 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加した。拡大培養開始後、14日目に、実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表16に示す。

一方、REM法による拡大培養は以下のように実施した。HLA-A24およびA2.1非保持allogenic PBMCをX線照射(3300R)し培地で洗浄後 $5\times 10^6\text{ cells}/\text{ml}$ に調製した。また、Epstein-Barr Virus感染ヒトB細胞株(EBV-B細胞)をX線照射(8000R)し、培地で洗浄後 $1\times 10^6\text{ cells}/\text{ml}$ に調製した。実施例3-1-(1)で調製したCTL($2.5\times 10^4\text{ cells}$)とallogenic PBMC($1.25\times 10^7\text{ cells}$)、EBV-B細胞($2.5\times 10^6\text{ cells}$)を10mlの5HRPMIに懸濁し、さらに終濃度 $50\text{ ng}/\text{ml}$ の抗CD3抗体(ヤンセン協和社製)を加えて 12.5 cm^2 のフラスコ(ファルコン社製)に入れ、 37°C の湿式 CO_2 インキュベーター中で14日間培養した。この際、試料として終濃度 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加する群と添加しない群を設定した。EBV-B細胞を除いた以外は上記と同様に調製したフラスコも上記と同様に培養した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 $120\text{ U}/\text{ml}$ の $1\text{ L}-2$ を添加、さらに培養開始後4日目以降は2〜3日ごとに培養上清を半分除去後、 $1\text{ L}-2\ 60\text{U/ml}$ 含む5HRPMI 5 ml を各フラスコに添加した。この際、試料添加群の培地には終濃度 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように製造例1で調製したガゴメ昆布由来フコイダンを添加した。拡大培養開始後、14日目に、実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その結果を表17に示す。

表 1 6

試料	試料添加		EBV-B 細胞 添加	拡大 増殖 率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性（％）		
	CTL 誘導時	拡大 培養時				E/T比		
						3	10	30
対照	—	—	—	×494	—	1.2	2.0	8.4
	—	—	—	×494	+	14.7	38.8	70.3
ガゴメ昆布由来 フコイダン	—	+	—	×694	—	2.2	5.8	7.8
	—	+	—	×694	+	26.4	62.3	83.8
	+	—	—	×488	—	3.2	7.2	18.5
	+	—	—	×488	+	44.7	84.2	102.6
	+	+	—	×513	—	3.2	5.4	7.6
	+	+	—	×513	+	47.4	87.0	108.3

表 1 7

試料	試料添加		EBV-B 細胞 添加	拡大 増殖 率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性（％）		
	CTL 誘導時	拡大 培養時				E/T比		
						3	10	30
対照	—	—	—	×494	—	1.2	2.0	8.4
	—	—	—	×494	+	14.7	38.8	70.3
R E M法	—	—	+	×713	—	0	0	4.8
	—	—	+	×713	+	27.5	68.4	94.9
R E M法＋ ガゴメ昆布 由来 フコイダン	—	+	+	×656	—	0.8	0.8	0
	—	+	+	×656	+	35.2	74.1	102.8
	+	—	+	×662	—	1.1	1.8	6.2
	+	—	+	×662	+	72.7	95.3	92.8
	+	+	+	×638	—	0	1.5	4.8
	+	+	+	×638	+	65.0	88.5	98.6

その結果、ガゴメ昆布由来フコイダンを添加せずに誘導したCTL (CTL誘導剤無添加) は、REM法で拡大培養した場合には高い細胞傷害活性を維持していた。しかし、EBV-B細胞を使用しないREM法で拡大培養を行った場合には細胞傷害活性は著しく低下した。

一方、ガゴメ昆布由来フコイダンをCTL誘導時と拡大培養時の両方、あるいは

はどちらか一方に添加しておくこととBBV-B細胞を添加しなくても14日間の大量培養後におけるCTL細胞傷害活性を十分高く維持させることができた。さらに、本発明による拡大培養後の抗原特異的細胞傷害活性は、REM法と比較しても高いものであった。

また、REM法で拡大培養する場合、拡大培養に先立ち、CTL誘導時から、本発明の方法のCTL活性維持効果を持つ化合物の1つであるガゴメ昆布由来フコイダンを添加しておくこと、従来技術で誘導したCTL細胞を単にREM法で拡大培養することにより、細胞傷害活性を高く維持することができた。

つまり、本発明による、CTL活性維持効果を持つ化合物を添加する拡大培養方法においては、REM法では必須であるBBV-B細胞を必要とせず、BBV-B細胞を用いる危険性を回避することができる。さらに、REM法より高いCTL活性が維持できる。これらのことより、本発明のCTL細胞の拡大方法は、REM法より、安全で優れた方法である。

さらに、本発明で使用される化合物をREM法に導入するとさらに高い活性を保持するCTLを拡大培養することができる。すなわち、本発明で使用される化合物は、あらゆるCTLの拡大培養方法への適応が可能であり、様々なCTL拡大培養方法において本発明で使用される化合物を使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態を維持できることが明らかとなった。

実施例3-2

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPEMCを用い、実施例1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、試料としてヒアルロン酸を終濃度10 μ g/mlとなるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1

－（３）と同様の方法にて評価した。抗原ペプチドにはFluMP A2.1を用いた。

（２）CTLの拡大培養

実施例３－２－（１）で調製したCTLを実施例３－１－（２）と同様に拡大培養をおこなった。この際、試料として終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにヒアルロン酸を添加する群と添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 $120\text{U}/\text{ml}$ のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2～3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 $60\text{U}/\text{ml}$ を含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。この際、試料添加群の培地には終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにヒアルロン酸を添加した。拡大培養開始後、14日目に、実施例1-1-（３）と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表18に示す。

表 18

試料	試料添加		EBV-B 細胞 添加	拡大 増殖 率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性（％）
	CTL 誘導時	拡大 培養時				E/T比 10
対照	－	－	－	×392	－	6.2
ヒアルロン酸	－	－	－	×392	＋	10.6
	＋	＋	－	×335	－	2.3
	＋	＋	－	×335	＋	60.0
REM法	－	－	＋	×427	－	11.5
REM法＋ ヒアルロン酸	－	－	＋	×427	＋	52.8
	＋	＋	＋	×587	－	8.1
	＋	＋	＋	×587	＋	95.5

その結果、ヒアルロン酸を添加せずに誘導したCTL（CTL活性維持試薬無添加）は、REM法で拡大培養した場合には高い細胞傷害活性を維持していた。しかし、EBV-B細胞を使用しないREM法で拡大培養を行った場合には細胞傷害活性は著しく低下した。

一方、ヒアルロン酸をCTL誘導時と拡大培養時の両方に添加しておくこととEBV- γ 細胞を添加しなくても14日間の大量培養後におけるCTL細胞傷害活性を十分高く維持させておくことができた。さらに、本発明による拡大培養後の標的的特異的細胞傷害活性は、REM法と比較しても高いものであった。

また、REM法で拡大培養する場合、拡大培養に先立ち、CTL誘導時から、本発明の方法のCTL活性維持効果を持つ化合物の1つであるヒアルロン酸を添加しておくこと、従来技術で誘導したCTL細胞を単にREM法で拡大培養するより、細胞傷害活性を高く維持することができた。

つまり、本発明のCTLの拡大培養方法においては、REM法では必須であるEBV- γ 細胞を必要とせず、EBV- γ 細胞を用いる危険性を回避することができる。さらに、REM法より高いCTL活性が維持できる。これらのことより、本発明のCTL細胞の拡大方法は、REM法より、安全で優れた方法である。

さらに、ヒアルロン酸をREM法に導入するとさらに高い活性を保持することができ、ヒアルロン酸はあらゆるCTL細胞の拡大培養方法への適応が可能であり、様々なCTL拡大培養方法に本発明で用いられる化合物を添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になる。

実施例 4 ヒアルロン酸を用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの拡大培養

実施例 4-1

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、ヒアルロン酸(Calbiochem社製)を終濃度10 μ g/mlとなるように添加した。さらに、ヒアルロン酸を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんど無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例4-1-(1)で調製したCTLを用い、実施例2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例4-1-(1)でのCTL誘導の際に添加したヒアルロン酸を終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加する群と誘導時からヒアルロン酸を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 $120\text{U}/\text{ml}$ のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 $60\text{U}/\text{ml}$ およびヒアルロン酸 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、ヒアルロン酸を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表19に示す。

表 19

試料	試料添加		拡大 増殖率	ペプ チド 付加	細胞傷害活性 (%)			
	CTL 誘導時	拡大 培養時			1	3	E/T比 10	30
対照	—	—	×547	—	7.3	8.4	9.1	12.7
	—	—	×547	+	8.1	11.2	21.5	45.9
ヒアルロン酸	+	+	×493	—	7.3	8.6	13.1	17.0
	+	+	×493	+	31.1	49.8	90.8	105.6

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にヒアルロン酸を添加した群におい

ては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにも試料を添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、ヒアルロン酸をCTL誘導時および拡大培養時に添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 4-2

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPEMCを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、ヒアルロン酸を終濃度10 μ g/mlとなるように添加した。さらに、試料を添加しない群も設定した。抗原ペプチドにはFluMPA2.1を用いた。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんど無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例 4-2-(1)で調製したCTLを用い、実施例 2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例 4-2-(1)でのCTL誘導の際に添加したヒアルロン酸はまったく添加しなかった。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/mlを含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。拡大培養開始後、14日目に実施例 1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表20に示す。

表 2 0

試料	試料添加		拡大増殖率	ペプチド付加	細胞傷害活性 (%)			
	CTL誘導時	拡大培養時			1	3	E/T比10	30
対照	—	—	×480	—	0	0	0.4	6.8
	—	—	×480	+	4	11.2	29.3	59.7
ヒアルロン酸	+	+	×423	—	0	0	1.9	14.3
	+	+	×423	+	7.2	23.3	59.6	85.1
	+	—	×393	—	3.0	1.4	4.7	9.3
	+	—	×393	+	9.9	22.1	47.7	78.0

その結果、CTL誘導時のみにヒアルロン酸を添加した群においては、拡大培養時にヒアルロン酸を添加しなくても、14日間の拡大培養後において特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもヒアルロン酸を添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、ヒアルロン酸をCTL誘導時のみに添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 5 腫瘍関連抗原特異的細胞傷害活性を保持するCTLの拡大培養

実施例 5-1

(1) 抗腫瘍関連抗原(MAGE3)特異的CTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、抗腫瘍関連抗原(MAGE3)特異的CTLの誘導を行った。抗腫瘍関連抗原(MAGE3)特異的CTLの誘導はPlebanskiらの方法(Eur. J. Immunol. (1994)25:1783-1787)を一部改変して実施した。すなわち、5%ヒトAB型血清、0.1mM 非必須アミノ酸、1mMビルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(全てBio Whittaker 社製)、

10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1 %ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL 社製)を含むRPMI1640培地(Bio Whittaker社製)(以下5HRPMIと略す)に $2 \sim 4 \times 10^7$ cells/ml となるように実施例1-1-(1)で調製したPBMCを懸濁後半量に分けた。半量はレスポンダー細胞として氷上保存とし、もう半量は抗原提示細胞として用い、抗原ペプチドとしてメラノーマ抗原MAGE 3 由来エピトープペプチド(配列表の配列番号: 3に記載のメラノーマ抗原MAGE3 由来HLA A2. 1 結合性ペプチド FLWGPRALV) $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $\beta 2$ マイクログロブリン(スクリプス社製) $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む5HRPMIを等量添加し、5 % CO₂ 湿式インキュベーター内にて、37℃で2時間インキュベートした。その後5HRPMIを用いて洗浄し氷上保存していたレスポンダー細胞と混合後、 2×10^6 cells/mlに調製した。IL-7 およびKLH をそれぞれ終濃度25 ng/ml、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、24穴細胞培養プレート(Falcon社製)に2ml /wellずつ入れた。このとき、L.M.W ヘパリン(生化学工業社製)またはヒアルロン酸(Calbiochem社製)を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。また対照として、試料を添加しない群も設定した。プレートを5 % CO₂ 中、37℃で培養した。

培養開始後4日目に培養上清を半分除去後、60U/mlのIL-2 と $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL.M.W ヘパリンもしくはヒアルロン酸を含む5HRPMI 1ml(対照は、IL-2 のみ含有)を各ウェルに添加した。

7日目に上記と同様にして抗原提示細胞を調製したあとX線照射(5500R)し、 4×10^6 cells/ml になるように調製した。1週間培養したレスポンダー細胞を 2×10^6 cells/ml となるように5HRPMIに懸濁、調製した抗原提示細胞と等量混合し、1ml/ウェルずつ24穴細胞培養プレートに添加し、さらに終濃度25ng/ml のIL-7を加えて再刺激した。このとき、L.M.W ヘパリンもしくはヒアルロン酸を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した(対照は、無添加)。再刺激後1日目に、IL-2 60U/mlおよび $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL.M.W ヘパリンもしくはヒアルロン酸を含む(対照は、IL-2 のみ含有)5HRPMI 1ml を各ウェルに添加、また3日目には培養上清

を半分除去後、除去前と同じ内容の培地を1ml ずつ添加した。同様の再刺激を1週間に1度、計4回実施しCTLを誘導した。

(2) CTL細胞傷害活性の測定

実施例5-1-(1)で調製した誘導開始後35日目のCTLの細胞傷害活性は実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。ただし、この際標的細胞として、一晚エпитープペプチドと共培養もしくはエпитープペプチド非存在下で培養したHLA-A2.1保持EBV トランスフォームB細胞(細胞名 221A2.1)を用いた。

この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時のL.M.Wヘパリンおよびヒアルロン酸添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんど無かった。

(3) CTLの拡大培養

実施例5-1-(1)で調製したCTLを用い、実施例2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例5-1-(1)でのCTL誘導の際に添加したL.M.Wヘパリンもしくはヒアルロン酸を10 μ g/mlとなるように添加する群と誘導時から試料を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml およびL.M.Wヘパリンもしくはヒアルロン酸10 μ g/mlを含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表21に示す。

表 2 1

試料	試料添加			ペプチド 付加	細胞傷害活性 (%)	
	CTL 誘導時	拡大 培養時	拡大 増殖率		E/T比 2	6
対照	—	—	×237	—	0	0
	—	—	×237	+	29.8	56
					E/T比 3	9
L. M. W. ヘパリン	+	+	×433	—	2.6	3.7
	+	+	×433	+	65.3	104.8
					E/T比 2	6
ヒアルロン酸	+	+	×217	—	3.6	0
	+	+	×217	+	50.3	67.7

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にL.M.W.ヘパリンもしくはヒアルロン酸を添加した群においては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもこれらの試料を添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、抗腫瘍関連抗原(MAGE3)CTLの拡大培養時においても、L.M.W.ヘパリンもしくはヒアルロン酸をCTL誘導時および拡大培養時に添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 5-2

(1) 抗腫瘍関連抗原(MART1)特異的CTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したP815を用い、実施例 5-1-(1)と同様の方法で抗腫瘍関連抗原(MART1)特異的CTLの誘導を行っ

た。抗原ペプチドとしてメラノーマ抗原MART1 由来エピトープペプチド（配列表の配列番号：4に記載のメラノーマ抗原MART1 由来HLA-A2.1結合性ペプチド AAGIGILTV）を用いた。このとき、ガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸（Calbiochem社製）を終濃度10 μ g/mlとなるように添加した。また対照として、試料を添加しない群も設定した。

こうして調製した誘導直後のCTLの細胞傷害活性は、実施例1-1-(3)と同様の方法にて評価した。ただしこの際、標的細胞としてエピトープペプチド非存在下で培養したHLA-A2.1保持EBV トランスフォームB 細胞（細胞名 221A2.1）、二晩100 U/ml IFN- γ 存在化で培養したHLA-A2.1保持ガン細胞株（細胞名 624me1；HLA-A2.1保持MART1 発現細胞）もしくはHLA-A2.1非保持ガン細胞株（細胞名 888me1；HLA-A2.1非保持MART1 発現細胞）を用いた。

この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんど無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例5-2-(1)で調製したCTLを用い、実施例2-1-(2)と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、実施例5-2-(1)でのCTL誘導の際に添加したガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸を10 μ g/mlとなるように添加する群と誘導時から試料を全く添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度120U/mlのIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml およびガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸10 μ g/mlを含む5HRPMI 5mlを各フラスコに添加した。ただし、試料を添加していない群においては、培地交換の際にも、試料の添加は行わなかった。拡大培養開始後、14日目に実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。測定結果を表22に示す。

表 2 2

試料	試料添加		拡大増殖率	ペプチド付加	標的細胞	細胞傷害活性 (%)		
	CTL誘導時	拡大培養時				2	E/T比 7	20
対照	—	—	×287	—	221A2.1	0	3.8	4.1
	—	—	×287	+	221A2.1	8.1	27.5	43.5
	—	—	×287	—	888mel	32.5	44.8	43.7
	—	—	×287	—	624mel	27.4	55.8	81.6
						2	E/T比 6	17
ガゴメ昆 布由来フ コイダン	+	+	×240	—	221A2.1	0	0	0
	+	+	×240	+	221A2.1	28.8	63.2	84.0
	+	+	×240	—	888mel	8.2	22.4	19.2
	+	+	×240	—	624mel	40.7	78.5	92.2
						2	E/T比 6	17
ヒアルロ ン酸	+	+	×217	—	221A2.1	0	0	0
	+	+	×217	+	221A2.1	9.1	52.8	74.4
	+	+	×217	—	888mel	0	0	0
	+	+	×217	—	624mel	29.6	73.8	90.6

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸を添加した群においては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもこれらの試料を添加しなかった群では、その活性は、明らかに低下していた。また腫瘍細胞株に対する特異的細胞傷害活性についてもCTL誘導時および拡大培養時にガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸を添加した群においては、CTLは14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、抗腫瘍関連抗原 (MART1) CTLの拡大培養時においても、ガゴメ昆布由来フコイダンもしくはヒアルロン酸をCTL誘導時および拡大培養時に添加することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

実施例 6 抗体結合マグネチックビーズによる細胞選択

実施例 6-1

(1) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例 1-1-(1)に記載の方法で分離、保存したPEMCを用い、実施例 1-1-(2)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの誘導を行った。その際、ガゴメ昆布由来フコイダンを終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。さらに、ガゴメ昆布由来フコイダンを添加しない群も設定した。

こうして調製した誘導開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、実施例 1-1-(3)と同様の方法にて評価した。この結果、誘導直後において、特異的細胞傷害活性は誘導されていたが、誘導時の試料添加の有無による細胞傷害活性の差はほとんど無かった。

(2) CTLの拡大培養

実施例 6-1-(1)で調製したCTLを用い、実施例 3-1-(2)と同様の方法でCTLの拡大培養を行った。この際、試料として終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるようにガゴメ昆布由来フコイダンを添加する群と添加しない群を設定した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に終濃度 120U/ml のIL-2を添加、さらに培養開始後4日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、IL-2 60U/ml 含む5HRPMI5ml を各フラスコに添加した。この際、試料添加群の培地には終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるようにガゴメ昆布由来フコイダンを添加した。拡大培養開始後、14日目に、実施例 1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。

(3) 抗体結合マグネチックビーズによる細胞選択

実施例 6-1-(2)で調製した拡大培養後のCTLを氷冷した2%FBS /PBSにて洗浄後、同バッファーにて $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ に調整した。これらの細胞懸濁液に、あらかじめ氷冷した2%FBS /PBS で洗浄しておいたDynabeads M-450 CD

4 (抗CD4 抗体結合マグネチックビーズ、ダイナル社製)を 1×10^7 cellsの細胞あたり150 μ l ずつ添加した。ビーズを含む細胞懸濁液を4 °Cで緩やかに振盪しながら30分インキュベートした。インキュベート後の細胞懸濁液の入ったチューブに氷冷した2%FBS /PBS を加え、Dynabeads 用磁石台 (ダイナル社製)を用いてビーズおよびビーズ結合細胞を除去した。このようにして得られた抗CD4 抗体結合ビーズ非結合細胞集団および選択前の細胞集団についてフローサイトメーターを用いてCD8 +細胞の含有率を確認した。その結果を表23に示す。さらに実施例1-1-(3)と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を比較した。この結果を表24に示す。

表 2 3

試料	試料添加		EBV-B 細胞 添加	CD8+ 細胞含有率 (%)	
	CTL 誘導時	拡大 培養時		選択前	選択後
対照	—	—	—	18.1	88.0
ガゴメ昆布由来 フコイダン	+	+	—	32.5	97.2
REM法+ ガゴメ昆布 由来フコイダン	+	+	+	55.8	97.3

表 2 4

試料	試料添加		EBV-B 細胞 添加	ペプ チド 付加	細胞傷害活性 (%) (E/T比=30)	
	CTL 誘導時	拡大 培養時			選択前	選択後
対照	—	—	—	—	10.4	9.4
	—	—	—	+	24.0	21.1
ガゴメ昆布由来 フコイダン	+	+	—	—	7.6	8.4
	+	+	—	+	41.8	75.3
REM法+ ガゴメ昆布 由来フコイダン	+	+	+	—	4.2	6.7
	+	+	+	+	87.8	88.2

その結果、CTL誘導時および拡大培養時にガゴメ昆布由来フコイダンを添加した群においては、抗体結合ビーズで細胞選択することによってその細胞傷害活性をさらに高くすることができた。また、REM法によりCTLを拡大培養し、抗体結合ビーズで細胞選択してもその細胞傷害活性は変わらなかった。また、REM法とガゴメ昆布由来フコイダン添加の併用条件で拡大培養後に抗体結合ビーズで細胞選択することによって、その細胞傷害活性をさらに高くすることが出来た。

寄託された生物材料

(1) 寄託機関の名称・あて名

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566）

(2) 寄託された微生物

(i) アルテロモナス (Alteromonas) sp. SN-1009

原寄託日 : 1996年2月13日

国際寄託への移管請求日 : 1996年11月15日

受託番号: FERM BP-5747

(ii) フラボバクテリウム (Flavobacterium) s.p. SA-0082

原寄託日 : 1995年3月29日

国際寄託への移管請求日: 1996年2月15日

受託番号: FERM BP-5402

配列表フリーテキスト

配列番号: 1 は、インフルエンザウイルス由来のヌクレオプロテインを元にデザインしたHLA A2.4結合性ペプチドである。

配列番号: 2 は、インフルエンザウイルス由来のマトリックスプロテインを元にデザインしたHLA A2.1結合性ペプチドである。

配列番号: 3 は、メラノーマ抗原MAGE 3由来のHLA A2.1結合性ペプチドを元にデザインしたペプチドである。

配列番号: 4 は、メラノーマ抗原MART 1由来のHLA A2.1結合性ペプチドを元にデザインしたペプチドである。

産業上の利用可能性

本発明により、抗原特異的な細胞傷害活性を高いレベルで保持したCTLを誘導、維持ならびに拡大培養する方法が提供される。当該方法は大量のCTLを必要とする養子免疫療法等の細胞医療の分野で極めて有用である。また当該方法により調製されるCTLは安全な方法で調製されることから、極めて安全性の高い細胞医薬となる。

請求の範囲

1. 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を誘導するための方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞への分化能を有する前駆細胞を抗原提示細胞とインキュベートする工程を含むことを特徴とする方法。

2. 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である請求項1記載の方法。

3. 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を維持するための方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞を継続培養する工程を含むことを特徴とする方法。

4. 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、ペクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である請求項3記載の方法。

5. 抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を拡大培養する方法であって、酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の存在下に細胞傷害性T細胞をインキュベート

する工程を含むことを特徴とする方法。

6. 前記工程において、さらに抗CD3抗体の存在下に細胞傷害性T細胞をインキュベートする請求項5記載の方法。

7. 前記工程において、細胞傷害性T細胞をフィーダ細胞とともにインキュベートする請求項5または6記載の方法。

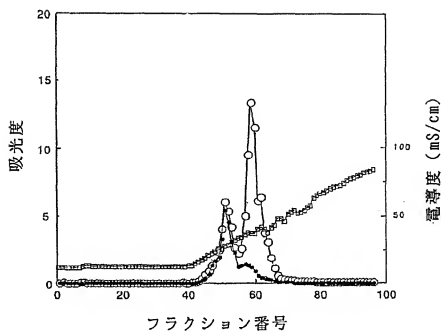
8. フィーダ細胞が非ウイルス感染細胞である請求項7記載の方法。

9. 化合物が、フコイダン、ヘパリン、アルギン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、バクチン酸、ヒアルロン酸、フコイダン分解物、硫酸化グルコース、硫酸化フコース及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種の化合物である請求項5～8いずれか記載の方法。

10. 請求項1～9いずれかに記載の方法によって得られた細胞傷害性T細胞含有培養物から抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞を高含有する細胞集団を選択する工程を含む細胞傷害性T細胞の回収方法。

11. 請求項1～10いずれかに記載の方法で調製された抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞。

12. 請求項11に記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有することを特徴とする治療剤。



第 1 図

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Method for expansion of antigen specific cytotoxic
T lymphocyte

<130> 01-056-PCT

<150> JP 2000-247072

<151> 2000-08-16

<160> 4

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed peptide based on nucleoprotein derived from influenza
virus.

<400> 1

Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu

5

10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed peptide based on matrixprotein derived from influenza virus.

<400> 2

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed peptide based on HLA A2.1 binding peptide derived from melanoma antigen MAGE3.

<400> 3

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Designed peptide based on HLA A2.1 binding peptide derived from
melanoma antigen MART1.

<400> 4

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/08, A61K35/26, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/08, A61K35/26, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WFIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Riddell S. R. et al., "Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones", Science, (1992), Vol.257, pages 238 to 241	1-12 1-10
A	Ikunoshin KATO et al., "Kaisou Shokumotsu Sen-i ni yoru Gan Risk Keigen", Sourui, March, 2000, Vol.48, pages 13 to 19	1-12
A	Noguchi K. et al., "Polysaccharide preparation PSK augments the proliferation and Cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in vitro", Anticancer Research, (1995), Vol.15, pages 255 to 288	1-12
A	WO 97/32970 A1 (Targeted Genetics Corporation), 12 September, 1997 (12.09.97), & EP 904350 A1 & AU 9721947 A1 & CA 2247131 A	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "B" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 November, 2001 (13.11.01)Date of mailing of the international search report
27 November, 2001 (27.11.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/08, A61K35/26, A61P37/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/08, A61K35/26, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STM)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Riddell SR. et al., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones, Science, 1992, Vol. 257, p. 238-241	<u>11, 12</u> 1-10
A	加藤郁之進・佐川裕章著, 海藻食物繊維による癌リスク軽減, 薬類, 2000 Mar., Vol. 48, p. 13-19	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 01

国際調査報告の発送日

27.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Noguchi K. et al., Polysaccharide preparation PSK augments the proliferation and Cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in vitro, Anticancer Research, 1995, Vol.15, p. 255-288	1-12
A	WO 97/32970 A1 (Targeted Genetics Corporation) 12.9月.1997 (12.09.97) & EP 904350 A1 & AU 9721947 A1 & CA 2247131 A	1-12